



Tepung terigu sebagai bahan makanan



Hak cipta dilindungi undang-undang. Dilarang menyalin atau menggandakan sebagian atau seluruh isi dokumen ini dengan cara dan dalam bentuk apapun dan dilarang mendistribusikan dokumen ini baik secara elektronik maupun tercetak tanpa izin tertulis dari BSN

BSN
Gd. Mangala Wanabakti
Blok IV, Lt. 3,4,7,10.
Telp. +6221-5747043
Fax. +6221-5747045
Email: dokinfo@bsn.go.id
www.bsn.go.id

Diterbitkan di Jakarta

© BSN 2009

Daftar isi

Daftar isi.....	i
Prakata	ii
Prakata	ii
1 Ruang lingkup	1
2 Acuan normatif.....	1
3 Istilah dan definisi	1
4 Komposisi	1
5 Syarat mutu.....	2
6 Pengambilan contoh	2
7 Cara uji	3
8 Syarat lulus uji.....	3
9 Pengemasan.....	3
10 Penandaan	4
Lampiran A (normatif) Cara uji tepung terigu sebagai bahan makanan	5
Bibliografi	39
Gambar A.1 - Metoda pengenceran	28
Tabel 1 - Syarat mutu tepung terigu sebagai bahan makanan.....	2
Tabel 2 - Cara uji untuk tepung terigu sebagai bahan makanan	3
Tabel A.3 - Reaksi biokimia <i>Escherichia coli</i> pada uji IMVIC	33
Tabel A.4 - APM per 1 g contoh bila menggunakan 3 tabung	33
untuk setiap tingkat pengenceran (1,0 g/ ml; 0,1 g/ ml, dan 0,01 g/ ml contoh)	33

Prakata

Standar Nasional Indonesia (SNI) *Tepung terigu sebagai bahan makanan* ini merupakan revisi SNI 01 – 3751 – 2006, *Tepung terigu sebagai bahan makanan* yang dirumuskan oleh Panitia Teknis Makanan dan Minuman. Tujuan penyusunan standar ini adalah:

- Melindungi kesehatan konsumen;
- Menjamin perdagangan pangan yang jujur dan bertanggung jawab;
- Mendukung perkembangan industri tepung terigu.

Standar ini dirumuskan dengan memperhatikan hal-hal yang tertera dalam:

1. Undang-undang RI No. 7 tahun 1996 tentang Pangan
2. Undang-undang RI No. 8 tahun 1999 tentang Perlindungan Konsumen
3. Peraturan Pemerintah No. 69 tahun 1999 tentang Label dan Iklan Pangan
4. SK Menteri Kesehatan RI No. 1452/Menkes/SK/X/2003 tentang Fortifikasi tepung terigu

Standar ini dirumuskan oleh Panitia Teknis 67 - 04 Makanan dan minuman. Standar ini telah dibahas melalui rapat teknis dan disepakati dalam rapat konsensus pada tanggal 5 November 2008 di Jakarta. Hadir dalam rapat tersebut wakil dari konsumen, produsen, lembaga pengujian, Lembaga IPTEK, dan instansi terkait lainnya.

Standar ini telah melalui proses jajak pendapat pada tanggal 24 Juni 2009 sampai dengan tanggal 22 Agustus 2009 dengan hasil RASNI.

Tepung terigu sebagai bahan makanan

1 Ruang lingkup

Standar ini menetapkan syarat mutu, pengambilan contoh dan cara uji untuk tepung terigu sebagai bahan makanan.

Standar ini tidak berlaku untuk:

- tepung terigu yang dibuat dari gandum jenis Durum (*Triticum durum* Desf);
- produk gandum keseluruhan (*whole meal*) dan semolina (*farina*);
- tepung terigu yang ditujukan untuk penggunaan bir (*brewing adjunct*) atau untuk pembuatan pati dan / atau gluten;
- tepung untuk keperluan non makanan;
- tepung terigu yang telah mengalami perlakuan khusus, selain perlakuan pengeringan, pemucatan.

2 Acuan normatif

SNI 19 – 0428 – 1998, *Petunjuk Pengambilan contoh padatan*.

3 Istilah dan definisi

3.1

tepung terigu sebagai bahan makanan

tepung yang dibuat dari endosperma biji gandum *Triticum aestivum* L. (*club wheat*) dan atau *Triticum compactum* Host atau campuran keduanya dengan penambahan Fe, Zn, vitamin B1, vitamin B2 dan asam folat sebagai fortifikan

3.2

benda asing

benda selain tepung terigu yang berasal dari kulit tanaman lain, tanah, batu-batuan, dan pasir

4 Komposisi

4.1 Bahan baku utama

Gandum.

4.2 Bahan baku lain yang harus ditambahkan

- Vitamin B1 (tiamin).
- Vitamin B2 (riboflavin).
- Asam folat.
- Besi (Fe) sebagai senyawa maupun bahan tambahan pangan yang diijinkan.
- Seng (Zn) sebagai senyawa maupun bahan tambahan pangan yang diijinkan.

4.3 Bahan tambahan pangan

Bahan tambahan pangan (BTP) yang diizinkan untuk tepung terigu sesuai dengan ketentuan tentang Bahan Tambahan Pangan (BTP).

5 Syarat mutu

Tabel 1 - Syarat mutu tepung terigu sebagai bahan makanan

Jenis uji	Satuan	Persyaratan
Keadaan: a. Bentuk b. Bau c. Warna	- - -	serbuk normal (bebas dari bau asing) putih, khas terigu
Benda asing	-	tidak ada
Serangga dalam semua bentuk stadia dan potongan-potongannya yang tampak	-	tidak ada
Kehalusan, lolos ayakan 212 μm (mesh No. 70) (b/b)	%	min 95
Kadar Air (b/b)	%	maks. 14,5
Kadar Abu (b/b)	%	maks. 0,70
Kadar Protein (b/b)	%	min. 7,0
Keasaman	mg KOH/ 100 g	maks 50
<i>Falling number</i> (atas dasar kadar air 14 %)	detik	min. 300
Besi (Fe)	mg/kg	min. 50
Seng (Zn)	mg/kg	min. 30
Vitamin B1 (tiamin)	mg/kg	min. 2,5
Vitamin B2 (riboflavin)	mg/kg	min. 4
Asam folat	mg/kg	min. 2
Cemaran logam: a. Timbal (Pb) b. Raksa (Hg) c. Kadmium (Cd)	mg/kg mg/kg mg/kg	maks. 1,0 maks. 0,05 maks. 0,1
Cemaran Arsen	mg/kg	maks. 0,50
Cemaran mikroba: a. Angka lempeng total b. <i>E. coli</i> c. Kapang d. <i>Bacillus cereus</i>	koloni/g APM/g koloni/g koloni/g	maks. 1×10^6 maks. 10 maks. 1×10^4 maks. 1×10^4

6 Pengambilan contoh

Cara pengambilan contoh sesuai SNI 19-0428-1998.

7 Cara uji

Tabel 2 - Cara uji untuk tepung terigu sebagai bahan makanan

No	Jenis uji	Metode uji sesuai lampiran
1 1.1 1.2 1.3	Keadaan: Bentuk Bau Warna	A.1
2	Benda asing	A.2
3	Serangga dalam semua bentuk stadia dan potongan-potongannya yang tampak	A.3
4	Kehalusan, lolos ayakan 212 μm No. 70 b/b	A.4
5	Kadar Air	A.5
6	Kadar Abu	A.6
7	Kadar Protein (N x 5,7)	A.7
8	Keasaman	A.8
9	<i>Falling number</i> (atas dasar kadar air 14 %)	A.9
10	Besi (Fe)	A.10
11	Seng (Zn)	A.11
12	Vitamin B1 (tiamin)	A.12
13	Vitamin B2 (riboflavin)	A.12
14	Asam folat	A.13
15	Cemaran logam:	A.14
15.1	Timbal (Pb) dan Kadmium (Cd)	A.14.1
15.2	Merkuri (Hg)	A.14.2
16	Cemaran arsen	A.15
17	Cemaran mikroba:	A.16
17.1	Angka lempeng total	
17.2	<i>E. coli</i>	
17.3	Kapang	
17.4	<i>Bacillus cereus</i>	

8 Syarat lulus uji

Contoh dinyatakan lulus uji apabila memenuhi persyaratan mutu sesuai Tabel 1.

9 Pengemasan

Produk tepung terigu dikemas dalam wadah yang tertutup rapat, tidak dipengaruhi atau mempengaruhi isi, aman selama penyimpanan dan pengangkutan.

10 Penandaan

Syarat penandaan produk tepung terigu sebagai bahan makanan harus diberi label. Keterangan pada label sekurang-kurangnya harus mencantumkan:

- Tanda SNI,
- Merek/nama dagang,
- Nama produk,
- Bobot bersih,
- Nama dan alamat produsen,
- Nama dan alamat importir (untuk produk impor),
- Daftar bahan yang digunakan,
- Senyawa fortifikan,
- Kedaluwarsa (baik digunakan sebelum tanggal).
- Kode produksi.



Lampiran A (normatif)

Cara uji untuk tepung terigu sebagai bahan makanan

A.1 Keadaan produk

A.1.1 Bentuk

A.1.1.1 Prinsip

Pengamatan contoh uji secara visual.

A.1.1.2 Cara kerja

- Taburkan contoh uji kira-kira 1 sendok makan pada wadah yang bersih.
- Lakukan pengamatan terhadap contoh uji tersebut untuk mengetahui bentuk contoh dengan meraba contoh uji.

A.1.1.3 Cara menyatakan hasil

- Apabila teraba serbuk, maka contoh uji tersebut mempunyai bentuk "serbuk".
- Apabila teraba selain serbuk, maka hasil analisis dinyatakan sesuai dengan pengamatan.

A.1.2 Bau

A.1.2.1 Prinsip

Analisis terhadap contoh uji secara organoleptik dengan menggunakan indera penciuman.

A.1.2.2 Cara kerja

- Taburkan contoh uji kira-kira 1 sendok makan pada wadah yang bersih dan tidak berbau.
- Lakukan penciuman terhadap contoh uji tersebut untuk mengetahui baunya (jarak hidung dengan contoh uji kira-kira 1/2 cm).

A.1.2.3 Cara menyatakan hasil

- Apabila tercium bau khas berarti contoh uji tersebut mempunyai bau yang normal.
- Apabila terdeteksi bau asing selain bau khas contoh uji, berarti contoh uji tersebut mempunyai bau yang menyimpang.

A.1.3 Warna

A.1.3.1 Prinsip

Analisis terhadap contoh uji secara organoleptik dengan menggunakan indera penglihatan terhadap warna.

A.1.3.2 Cara kerja

- Taburkan contoh uji kira-kira 1 sendok makan pada wadah yang bersih.

SNI 3751:2009

- Lakukan pengamatan terhadap contoh uji tersebut untuk mengetahui warna (jarak mata dengan contoh uji kira-kira 25 cm).

A.1.3.3 Cara menyatakan hasil

- Apabila terlihat warna putih khas terigu berarti contoh uji tersebut mempunyai warna yang normal.
- Apabila terdeteksi warna selain warna khas contoh uji, berarti contoh uji tersebut mempunyai warna yang menyimpang.

A.2 Benda asing

A.2.1 Prinsip

Contoh uji diamati secara organoleptik dengan indera penglihatan.

A.2.2 Cara kerja

- Periksa isi contoh secara organoleptik apakah mengandung benda lain selain tepung terigu misalnya: kulit tanaman selain gandum, tanah, pasir dan batu-batuan.
- Lakukan pengamatan terhadap contoh uji tersebut untuk mengetahui adanya benda asing tersebut.

A.2.3 Cara menyatakan hasil

- Apabila tidak terlihat benda asing, maka hasil dinyatakan "tidak ada."
- Apabila terlihat benda asing, maka hasil analisis dinyatakan sesuai dengan pengamatan.

A.3 Serangga dalam semua bentuk stadium dan potongan-potongan yang tampak (ulat, kepompong, serangga atau potongan serangga)

A.3.1 Prinsip

Contoh uji diamati secara visual dengan menggunakan kaca pembesar.

A.3.2 Peralatan

- Gelas piala 250 ml;
- Corong Buchner;
- Kertas saring;
- Kaca pembesar/mikroskop;
- Neraca analitik dengan ketelitian 0,1 g

A.3.3 Pereaksi

- Kloroform (CHCl_3)
- Karbon tetraklorida (CCl_4)

A.3.4 Cara kerja

- Timbang 50 g contoh ke dalam piala gelas 250 ml.
- Tambah CHCl_3 sampai 1 cm di atas permukaan contoh, biarkan mengendap minimal selama 30 menit.
- Aduk bagian yang mengambang di atas permukaan lapisan beberapa kali.

- d) Tuangkan CHCl_3 dan bagian yang mengambang ke dalam corong Buchner (hati-hati jangan sampai endapan yang dibagian bawah terbawa.)
- e) Tambah CCl_4 sebanyak volume CHCl_3 dan bagian yang mengambang tertinggal dalam gelas piala.
- f) Biarkan mengendap lagi dan tuangkan lagi seperti di atas.
- g) Pengendap tuangan diulangi dengan campuran CHCl_3 dan CCl_4 sampai bagian yang mengambang tinggal sedikit (hati-hati jangan sampai bagian serangga yang ada ikut terbang).
- h) Cuci endapan dalam gelas piala dengan CHCl_3 atau CCl_4 melalui kertas saring,
- i) Amati kertas saring menggunakan kaca pembesar/mikroskop

A.3.5 Cara menyatakan hasil

Hasil uji dinyatakan "tidak ada" apabila tidak nampak serangga dalam bentuk stadium dan bentuk potongannya (ulat, kepompong, serangga atau potongan-potongan serangga). Apabila terlihat maka hasil uji dinyatakan sesuai dengan hasil pengamatan.

A.4 Kehalusan

A.4.1 Prinsip

Pengukuran derajat kehalusan dari contoh dengan menggunakan ayakan ukuran 212 μm .

A.4.2 Peralatan

- a. Alat penggoyang ayakan
- b. Ayakan dan piring/penampung 8 inci , 212 μm (70 mesh)
- c. Neraca analitik dengan ketelitian 0,1 g

A.4.3 Cara kerja

- Timbang 50 g \pm 0,1 g contoh, masukkan ke dalam ayakan yang dipasang pada alat penggoyang, dan goyangkan selama 5 menit (W_2).
- Timbang bagian yang tertinggal dalam ayakan (W_1).

A.4.4 Perhitungan

$$\text{Kehalusan (\%)} = 100 - \left[\left(\frac{W_1}{W_0} \right) \times 100\% \right]$$

Keterangan:

W_1 adalah bobot bagian yang tertinggal dalam ayakan, (g);

W_2 adalah bobot contoh, (g).

A.5 Kadar air

A.5.1 Prinsip

Kehilangan bobot yang terjadi pada pemanasan dalam oven dengan suhu 130 °C selama 1 jam.

A.5.2 Peralatan

- a) Eksikator yang berisi desika
- b) Botol timbang alumunium dengan penutup Ø 5 cm, tinggi 3 cm
- c) Oven terkalibrasi dengan ketelitian 1 °C
- d) Neraca analitik, terkalibrasi dengan ketelitian 0,1 mg

A.5.3 Cara kerja

- a) Panaskan botol timbang beserta tutupnya dengan oven pada suhu (130 ± 3) °C selama satu jam, dinginkan dalam eksikator selama 30 menit dan ditimbang.
- b) Timbang 2 g contoh ke dalam botol timbang (W).
- c) Panaskan botol timbang dalam keadaan terbuka dalam oven pada suhu (130 ± 3) °C selama satu jam (satu jam setelah suhu oven 130 °C).
- d) Tutup botol timbang ketika masih di dalam oven, kemudian pindahkan ke dalam eksikator, dinginkan selama 30 menit dan ditimbang (W_1).
- e) Lakukan duplo.
- f) Hitung kadar air dalam contoh.

A.5.4 Perhitungan

$$\text{Kadar air} = \left[\left(\frac{W - W_1}{W} \right) \right] \times 100\%$$

Keterangan:

W_1 adalah bobot contoh setelah dipanaskan (g);

W adalah bobot awal contoh (g).

A.5.5 Ketelitian

Kisaran hasil dua kali ulangan maksimal 5 % dari nilai rata-rata hasil kadar air atau deviasi (RSD) maksimal 2 %. Jika kisaran lebih besar dari 5 % atau deviasi lebih besar dari 2 % analisis harus diulang kembali.

A.6 Kadar Abu

A.6.1 Prinsip

Pengabuan contoh dalam tanur pada suhu 550 °C zat-zat organik diuraikan menjadi air dan CO₂, sedangkan zat-zat anorganik yang tertinggal dihitung sebagai kadar abu.

A.6.2 Peralatan

- a) Eksikator yang berisi desikan
- b) Cawan porselin, kuarsa atau platina dengan volume 30 ml sampai 50 ml
- c) Tanur listrik, terkalibrasi dengan ketelitian 1 °C
- d) Neraca analitik terkalibrasi dengan ketelitian 0,1 mg.
- e) Penangas listrik/bunsen.

A.6.3 Cara kerja

- a) Pijarkan cawan di dalam tanur listrik pada suhu (550 ± 10) °C, yang sebelumnya dipanaskan dahulu pada penangas listrik/Bunsen dengan nyala api kecil selama 1 jam.
- b) Dinginkan dalam eksikator selama 1 jam, kemudian timbang (W_1).

- c) Timbang 3 g sampai dengan 5 g contoh (W).
- d) Arangkan di atas penangas listrik/Bunsen dengan nyala api kecil.
- e) Abukan dalam tanur pada suhu $(550 \pm 10) ^\circ\text{C}$ sampai putih atau kelabu selama 5 jam sampai dengan 8 jam.
- f) Dinginkan dalam eksikator selama 30 menit dan timbang.
- g) Masukkan kembali ke dalam tanur pada suhu yang sama selama 1 jam, dinginkan dalam eksikator dengan waktu yang sama dan timbang.
- h) Ulangi seperti pada butir g sampai diperoleh bobot tetap (selisih penimbangan yang terakhir dan yang sebelumnya maksimum 1 mg (W_2)).
- i) Lakukan duplo.
- j) Hitung kadar abu dalam contoh.

A.6.4 Perhitungan

$$\text{Kadar abu} = \left(\frac{W_2 - W_1}{W} \right) \times 100\%$$

Keterangan:

W adalah bobot contoh (g),

W_1 adalah bobot cawan kosong (g),

W_2 adalah bobot cawan kosong dan abu (g).

A.6.5 Ketelitian

Kisaran hasil dua kali ulangan maksimal 5 % dari nilai rata-rata hasil kadar abu atau deviasi(RSD) maksimal 3 %. Jika kisaran lebih besar dari 5 % atau RSD lebih besar dari 3 %, maka analisis harus diulang kembali.

A.7 Kadar protein (N x 5,7)

A.7.1 Prinsip

Senyawa protein didistruksi dengan asam sulfat dan katalis selen menjadi amonium sulfat yang diuraikan menjadi amoniak pada saat destilasi menggunakan NaOH. Amoniak yang dibebaskan diikat dengan asam borat menghasilkan amonium borat yang secara kuantitatif dititrasi dengan larutan baku asam.

A.7.2 Preaksi

- a) Campuran katalis selen p.a
- b) Indikator campuran *bromocresol green* (BCG) + merah metil (MM)
- c) Timbang 0,15 g (BCG) dan 0,10 g MM, dilarutkan dalam 250 ml etanol 95 %.
- d) Larutan asam borat H_3BO_3 2 %
- e) Larutkan 60 g H_3BO_3 dalam 3000 mL air suling, pindahkan ke dalam botol bertutup gelas.
- f) Larutan HCl 0,05 N
- g) Encerkan 4,20 ml HCl pekat dengan air suling menjadi 1000 mL.
- h) Larutan NaOH 30 %
- i) Larutkan 600 g hablur NaOH ke dalam 2000 ml air suling, simpan ke dalam botol bertutup karet.
- j) H_2SO_4 pekat
- k) Larutan indikator *fenolftalin* (PP) 1 %
- l) Larutkan 1 g serbuk indikator PP dengan alkohol 95 % dan encerkan menjadi 100 mL

A.7.3 Peralatan

- Labu Kjeldahl 100 ml
- Distilator dan kelengkapannya
- Pemanas listrik / alat destruksi dilengkapi dengan penghisap asap
- Neraca analitik terkalibrasi dengan ketelitian 0,1 mg
- Buret 10 ml terkalibrasi
- Batu didih.

A.7.4 Cara kerja

- Timbang 0,5 g sampai dengan 1 g contoh, masukkan ke dalam labu Kjeldahl.
- Tambahkan 1 g campuran katalis selen dan 10 ml H₂SO₄ pekat.
- Panaskan campuran dalam pemanas listrik sampai mendidih dan larutan menjadi jernih kehijau-hijauan. Lakukan dalam lemari asam atau lengkapi alat destruksi dengan unit penghisap asap.
- Biarkan dingin, kemudian encerkan dengan air suling secukupnya.
- Tambahkan 15 ml atau lebih larutan NaOH 30 % sampai berlebih (periksa dengan indikator PP dimana campuran diharapkan menjadi basa).
- Sulingkan selama 5 menit sampai dengan 10 menit atau saat larutan distilat telah mencapai kira-kira 150 ml, dengan penampung distilat adalah 50 ml larutan H₃BO₃ 2 % yang telah diberikan beberapa tetes campuran indikator BCG + MM.
- Bilas ujung pendingin dengan air suling.
- Titrat larutan campuran distilat dengan larutan HCl 0,05 N.
- Kerjakan penetapan blanko.

A.7.5 Perhitungan

$$\text{Kadar protein (\%)} = \frac{[(V_1 - V_2) \times N \times 14,008 \times 5,7 \times 100 \%]}{W}$$

Keterangan:

- V₁ adalah volume HCl 0,05 N untuk titrasi contoh (mL),
 V₂ adalah volume HCl 0,05 N untuk titrasi blanko (ml),
 N adalah normalitas larutan HCl,
 W adalah bobot contoh (mg),
 14,008 adalah bobot atom nitrogen,
 5,7 adalah faktor protein untuk tepung terigu.

A.7.6 Ketelitian

Kisaran hasil dua kali ulangan maksimal 5 % dari nilai rata-rata hasil kadar protein atau deviasi (*RSD*) maksimal 3 %. Jika kisaran lebih besar dari 5 % atau *RSD* lebih besar dari 3 % analisis harus diulang kembali.

A.8 Keasaman

A.8.1 Prinsip

Lemak dari hasil ekstraksi contoh dilarutkan pelarut organik yang dilanjutkan dengan penitrasi menggunakan KOH.

A.8.2 Peralatan

- Buret 10 ml, terkalibrasi
- Erlenmeyer asah 250 mL
- Alat ekstraksi lemak
- Gelas ukur 100 mL
- Penangas air
- Neraca analitik terkalibrasi dengan ketelitian 0,1 mg.

A.8.3 Pereaksi

- Larutan toluena-alkohol fenolftalein (PP) 0,02 %
Tambahkan 0,4 g PP ke dalam campuran 1 L toluena dan 1 L alkohol.
- Larutan indikator PP 0,04 %
tambahkan 0,4 g PP ke dalam satu L alkohol.
- Petroleum-eter 40-60
- Larutan KMnO_4 0,01 %
- Larutan $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ 0,5 %
- Larutan baku KOH alkohol 0,0178 N (bebas karbonat)
 - Larutkan 1 g KOH dalam 20 ml air suling bebas CO_2 , kemudian encerkan sampai 1 L dengan alkohol 95 %, kocok hingga homogen dan simpan dalam botol coklat bertutup karet (biarkan semalam sebelum digunakan).
 - Standardisasi larutan titar KOH alkohol 0,0178 N dengan menggunakan kalium hidrogen ftalat.
 - Keringkan kalium hidrogen ftalat dalam oven pada suhu 120 °C selama 2 jam, kemudian dinginkan dalam eksikator.
 - Timbang ($0,4 \pm 0,02$) g kalium hidrogen ftalat, masukkan ke dalam labu ukur 100 mL, larutkan dengan air suling dan impitkan.
 - Pipet 10 ml larutan tersebut ke dalam Erlenmeyer 250 ml, tambahkan 50 ml air suling dan beberapa tetes PP.
 - Titar dengan larutan baku KOH alkohol hingga timbul warna merah muda (merah jambu) yang stabil.
 - Hitung normalitas KOH alkohol.

$$\text{Normalitas KOH} = \frac{\text{bobot kalium hidrogen ftalat}}{\text{ml KOH} \times 0,20444 \text{ g}}$$

A.8.4 Cara kerja

- Ekstrak ($10 \pm 0,01$) g contoh dengan pelarut petroleum eter 40-60 selama 16 jam di atas alat ekstraksi lemak.
- Uapkan di atas penangas air sampai pelarut menguap semuanya dan tertinggal residu lemak.
- Larutkan residu lemak dengan 50 ml larutan toluena-alkohol PP.
- Titar dengan KOH sampai warna merah jambu atau larutan kuning menjadi sindur merah jambu. Jika terjadi emulsi selama penitaran, tambahkan lagi 50 ml larutan toluena-alkohol PP. Titik akhir harus sebanding dengan warna larutan yang dibuat dari penambahan 2,5 ml larutan KMnO_4 0,01 % pada 50 ml larutan $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ 0,5 % (tambahkan beberapa tetes $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ 0,5 % pada 50 ml air, kemudian tambahkan 5 ml larutan KMnO_4 0,01 %, dan dicampur dalam keadaan selalu baru).
- Buat larutan blanko dengan penambahan pereaksi yang sama seperti untuk contoh.

A.8.5 Perhitungan

Keasaman lemak dihitung sebagai mg KOH yang dipergunakan untuk menetralkan asam lemak bebas dari 100 g contoh.

$$\text{Keasaman lemak} = (V - V_1) \times 10$$

Keterangan:

V adalah volume KOH yang diperlukan dalam penitaran contoh (ml),

V₁ adalah volume penitaran blanko (ml).

A.9 *Falling number*

A.9.1 Prinsip

Mengukur aktifitas enzim α -amylase dalam contoh tepung terigu dengan menggunakan alat *falling number*.

A.9.2 Peralatan

- a) Alat *falling number*
- b) Neraca analitik terkalibrasi dengan ketelitian 0,01 g
- c) Pipet volume 25 ml terkalibrasi

A.9.3 Pereaksi

Air suling

A.9.4 Cara kerja

- a) Nyalakan alat *falling number* sesuai petunjuk kerja alat.
- b) Tambahkan 25 ml air suling ke dalam dua tabung viscometer.
- c) Timbang dua contoh(duplo) masing-masing $(7,00 \pm 0,01)$ g, kemudian masukkan dalam tabung viscometer.
- d) Baca nilai *falling number* pada *counter* sebagai total waktu (detik).

A.9.5 Perhitungan

Nilai *falling number* (FN) tidak boleh untuk perhitungan komposisi campuran tepung secara langsung. FN mempunyai hubungan kurva linier dengan aktifitas enzim α – amylase.

$$\text{Falling Number (Kadar air 14 \%)} = \frac{\text{FN contoh} (100 - 14)}{(100 - M)}$$

Keterangan:

M adalah kadar air dari contoh.

A.9.6 Ketelitian

Kisaran hasil dua kali ulangan maksimal 5 % dari nilai rata-rata hasil *falling number* atau maksimal 2,5 % dari deviasi (RSD). Jika kisaran lebih besar dari 5 % atau RSD lebih besar dari 2,5 % analisis harus diulang kembali.

A.10 Besi (Metode Spektrometer Serapan Atom, SSA)

A.10.1 Prinsip

Contoh didestruksi dengan asam menjadi larutan Fe. Larutan Fe ditetapkan dengan metode SSA pada panjang gelombang 248,3 nm.

A.10.2 Pereaksi

- HCl 5 N
Encerkan 415 ml HCl 37 %, Bj 1,19, ke dalam labu ukur satu L impitkan dan kocok.
- HNO₃ 1 N
Larutkan 350 ml HNO₃ 65 %, Bj 1,4 ke dalam labu ukur satu L impitkan dan kocok.
- HNO₃ pekat (65 %, BJ 1,4)
- Larutan baku Fe 1000 mg/L
Encerkan larutan baku Fe (Titrisol) ke dalam labu ukur satu L dengan HCl 5N / HNO₃ 1 N, impitkan dan kocok. Simpan dalam botol pereaksi.
- Larutan baku Fe 50 mg/l
Pipet 5 ml larutan baku Fe ke dalam labu ukur 100 ml, impitkan dan kocok.
- Larutan deret baku kerja Fe (0,4 mg/l; 1 mg/l; 3 mg/l; 4 mg/l; 6 mg/l dan 8 mg/l).
Pipet larutan baku Fe 50 mg/l ke dalam labu ukur 100 ml, masing-masing 0,4 ml; 1,0 ml; 3,0 ml; 4,0 ml; 6,0 ml dan 8,0 ml menggunakan pipet ukur 10 ml atau buret 10 ml, tambahkan 10 ml HCl 5 N/10 ml HNO₃ 1 N ke dalam masing-masing labu tersebut, impitkan dan kocok.

A.10.3 Peralatan

- Pipet volumetrik 1 ml, 2 ml, 5 ml, dan 10 ml atau buret 10 ml dengan ketelitian 0,05 ml.
- Labu ukur 25 ml, 50 ml, 100 ml dan 1 l.
- Cawan kuarsa/porselin/platina kapasitas 30 ml sampai dengan 50 ml.
- Tanur listrik terkalibrasi dengan ketelitian 1 °C.
- Neraca analitik terkalibrasi dengan ketelitian 0,1 mg.
- SSA terkalibrasi dengan lampu katoda Fe.
- Gelas piala 50 ml - 100 ml.
- Tabung plastik/tabung kaca.
- Microwave dan tabung vessel.

A.10.4 Cara kerja

A.10.4.1 Cara pengabuan kering

- Timbang contoh sebanyak 2 g sampai dengan 3 g dalam cawan.
- Arangkan diatas penangas listrik atau nyala api kecil, kemudian abukan dalam tanur listrik pada suhu (550 ± 10) °C sampai putih atau kelabu.
- Larutkan abu dengan 10 ml HCl 5 N atau HNO₃ 1 N (panaskan di atas penangas listrik hingga abu larut sempurna)
- Masukkan ke dalam labu ukur 50 ml, bilas cawan hingga bersih, kemudian impitkan dan kocok.
- Buat larutan blanko dengan penambahan pereaksi seperti contoh.
- Baca absorben masing-masing larutan baku kerja Fe, larutan contoh dan blanko dengan alat SSA pada panjang gelombang 248,3 nm.
- Buat kurva kalibrasi dengan sumbu Y sebagai absorbendan sumbu X sebagai konsentrasi (µg/ml).
- Plot hasil pembacaan contoh pada kurva kalibrasi.
- Hitung kandungan Fe dalam contoh.

A.10.4.2 Cara pengabuan basah

- Timbang contoh sebanyak 0,5 g dalam tabung plastik/kaca/dalam gelas piala dan tambahkan 5 ml HNO₃ pekat (65 %, Bj 1,4).
- Panaskan dalam penangas air pada suhu 100 °C selama 1 jam kemudian didinginkan.
- Masukkan ke dalam labu ukur 25 ml sambil disaring, kemudian impitkan dan kocok.
- Buat larutan blanko dengan penambahan pereaksi seperti contoh.
- Baca absorben masing-masing larutan baku kerja Fe, larutan contoh dan blanko dengan alat SSA pada panjang gelombang 248,3 nm.
- Buat kurva kalibrasi dengan sumbu Y sebagai absorben dan sumbu X sebagai konsentrasi (dalam µg/ml).
- Plot hasil pembacaan contoh pada kurva kalibrasi.
- Hitung kandungan Fe dalam contoh.

A.10.4.3 Cara destruksi *microwave*

- Timbang contoh sebanyak 0,5 g dalam tabung vessel tertutup dan tambahkan 5 ml HNO₃ pekat (65 %, Bj 1,4).
- Masukkan tabung yang sudah dikencangkan ke dalam alat *microwave*.
- Panaskan contoh dengan *microwave digester* sesuai program kerja alat untuk tepung terigu sampai sempurna, kemudian didinginkan.
- Masukkan ke dalam labu ukur 25 ml, kemudian impitkan dan kocok.
- Buat larutan blanko dengan penambahan pereaksi seperti contoh.
- Baca absorben masing-masing larutan baku kerja Fe, larutan contoh dan blanko dengan alat SSA pada panjang gelombang 248,3 nm.
- Buat kurva kalibrasi dengan sumbu Y sebagai absorben dan sumbu X sebagai konsentrasi (dalam µg/ml).
- Plot hasil pembacaan contoh pada kurva kalibrasi;
- Hitung kandungan Fe dalam contoh

A.10.5 Perhitungan

$$\text{Kadar besi (mg/kg)} = \frac{F \times b}{W}$$

Keterangan:

F adalah faktor pengenceran;

b adalah µg/ml dari kurva kalibrasi larutan deret baku Fe;

m adalah bobot contoh (g).

A.10.6 Ketelitian

Kisaran hasil dua kali ulangan deviasi (*RSD*) maksimal 7 %. Jika *RSD* lebih besar dari 7 %, maka analisis harus diulang kembali.

A.11 Seng (Zn)**A.11.1 Prinsip**

Peleburan contoh dengan cara pengabuan kering, dilanjutkan dengan pelarutan dalam larutan asam, kemudian absorben dibaca menggunakan alat SSA.

A.11.2 Peralatan

- Neraca analitik terkalibrasi dengan ketelitian 0,1 mg.
- Cawan porselen/platina/kuarsa dengan kapasitas 50 ml sampai dengan 100 ml.

- c) Penangas listrik.
- d) Tanur terkalibrasi suhu 500 °C dengan ketelitian 1 °C.
- e) SSA terkalibrasi dengan lampu katoda Zn.
- f) Pipet ukur berskala 0,1 kapasitas 5 ml dan 10 ml.
- g) Labu ukur 50 ml, 100 ml dan 1 000 ml, terkalibrasi.
- h) Gelas ukur kapasitas 10 ml.
- i) Penangas air.

A.11.3 Pereaksi

- a) Larutan HNO_3 0,1 N (larutan 7 ml HNO_3 65 %, encerkan menjadi 1 l dengan air suling)
- b) Larutan HCl 6 N (larutkan 500 ml HCl 37 %, encerkan menjadi 1 l dengan air suling)
- c) Larutan HNO_3 pekat (65 %, Bj 1,4)
- d) Larutan HCl pekat (37 %, Bj 1,19)
- e) Kertas Whatman No. 41
- f) Larutan baku Zn
- g) Sediaan larutan baku Zn 1000 $\mu\text{g/ml}$. Larutkan 1,000 g Zn dalam 7 ml HNO_3 pekat, kemudian masukkan ke dalam labu ukur 1000 ml, encerkan dengan air suling sampai tanda garis. Atau bisa digunakan larutan baku kerja Zn 1000 $\mu\text{g/ml}$ siap pakai.
- h) Larutan baku kerja
- i) Pipet 10,0 ml larutan baku Zn 1000 $\mu\text{g/ml}$ ke dalam labu ukur 100 ml. Encerkan dan tepatkan volume dengan larutan HNO_3 0,1 N dan kocok. Larutan baku kedua ini memiliki konsentrasi 100 $\mu\text{g/ml}$ Zn. Pipet masing-masing 0,25; 0,5; 1; 2 dan 4 ml larutan baku kedua ke dalam labu ukur 100 ml terpisah, kemudian encerkan tepatkan volume dengan larutan HNO_3 0,1 N. Larutan akhir baku kerja ini memiliki konsentrasi 0,25 $\mu\text{g/ml}$ Zn; 0,5 $\mu\text{g/ml}$ Zn; 1,0 $\mu\text{g/ml}$ Zn; 2,0 $\mu\text{g/ml}$ Zn dan 4,0 $\mu\text{g/ml}$ Zn.

A.11.4 Cara kerja

- a) Timbang dengan teliti 5 g contoh dalam cawan porselen/platina/kuarsa.
- b) Arangkan cawan berisi contoh di atas penangas listrik (untuk mempercepat pengabuan bila perlu tambahkan 10 ml $\text{MgNO}_3 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 10 % dalam alkohol), kemudian panaskan secara bertahap sampai contoh tidak berasap lagi.
- c) Lanjutkan pengabuan dalam tanur 500 °C sampai abu berwarna putih bebas dari karbon.
- d) Apabila abu masih terdapat sisa karbon, ditandai dengan warna keabu-abuan, basahkan abu dengan beberapa tetes air diikuti penambahan HNO_3 pekat, tetes demi tetes kira-kira 0,5 ml - 3 ml.
- e) Keringkan cawan di atas penangas listrik, dan masukkan kembali ke dalam tanur pada suhu 500 °C, lanjutkan pemanasan sampai abu menjadi putih. Penambahan HNO_3 pekat, bisa diulangi bila abu masih berwarna keabu-abuan.
- f) Larutkan abu berwarna putih dalam 5 ml HCl 6 N, sambil dipanaskan di atas penangas listrik atau penangas air selama 2 menit sampai 3 menit.
- g) Saring larutan melalui kertas saring whatman no.41 ke dalam labu ukur 50 ml.
- h) Cuci residu dengan 5 ml HNO_3 0,1 N, saring dan satukan filtrat ke dalam labu ukur 50 ml. Encerkan dan tepatkan sampai tanda garis dengan larutan HNO_3 0,1 N
- i) Siapkan larutan blanko dengan penambahan pereaksi dan perlakuan yang sama seperti contoh.
- j) Baca absorben larutan baku kerja, larutan contoh dan blanko dengan alat SSA pada panjang gelombang 213,9 nm.
- k) Buat kurva kalibrasi dengan sumbu Y sebagai absorben dan sumbu X sebagai konsentrasi ($\mu\text{g/ml}$).
- l) Plot hasil pembacaan contoh pada kurva kalibrasi.
- m) Hitung kandungan Zn dalam contoh.

A.11.5 Perhitungan

$$\text{Kadar n (mg/kg)} = \frac{F \times b}{W}$$

Keterangan:

F adalah faktor pengenceran;

b adalah µg/ml dari kurva kalibrasi larutan deret Zn;

W adalah bobot contoh (g).

A.11.6 Ketelitian

Kisaran hasil dua kali ulangan deviasi (RSD) maksimal 7 %. Jika RSD lebih besar dari 7 %, maka analisis harus diulang kembali.

A.12 Vitamin B1 (*tiamin*) dan vitamin B2 (*riboflavin*)

A.12.1 Prinsip

Ekstraksi vitamin dengan menggunakan asam klorida pada pH 4,5 yang kemudian dilakukan pemisahan melalui kolom jenis C18 dengan fase metanol–air yang mengandung campuran natrium heksan sulfonat dengan natrium heptan sulfonat atau campuran natrium heptan sulfonat dengan natrium pentan sulfonat yang diperiksa pada panjang gelombang 254 nm.

A.12.2 Peralatan

- a) HPLC yang dilengkapi dengan integrator
Detector UV, panjang gelombang 254 nm
Kolom : mikrobondapak C18 panjang 30 cm, diameter 3,9 mm
Kecepatan alir : 1,0 ml / menit
Penyaring : whatman No. 42 dan Millipore HV 0,15 µm
Volume injek : 20 µl
- b) Neraca analitik terkalibrasi dengan ketelitian 0,1 mg
- c) Penangas air
- d) Labu ukur (*amber glass*)
- e) Labu Erlenmeyer (*amber glass*)
- f) Pipet ukur (*amber glass*)
- g) Pipet volume (*amber glass*)
- h) Tabung kimia (*amber glass*)
- i) Spatula.

A.12.3 Pereaksi

- a) larutan HCl 0,1N
 - masukkan air suling ± 250 ml ke dalam labu ukur 1000 ml.
 - pipet 8,33 ml HCl pekat, masukkan dalam labu ukur.
 - encerkan hingga tanda tera dengan air suling.
 - kocok sampai homogen.
- b) Larutan natrium asetat 2 M
 - timbang 42,015 g natrium asetat.
 - masukkan dalam labu ukur 250 ml.
 - tambahkan 50 ml air suling, kocok sampai larut.
 - kocok hingga homogen.
- c) Standar vitamin B1

- d) Standar vitamin B2

A.12.4 Persiapan larutan standar vitamin B1 dan B2 100 µg/ml

- Timbang masing-masing standar dengan teliti 0,01 g.
- Masukkan pada labu Erlenmeyer 100 ml.
- Tambahkan 50 ml HCl 0,1 N, kemudian kocok.
- Panaskan pada suhu 95 °C sampai dengan 100 °C pada penangas air selama 30 menit.
- Dinginkan pada suhu kamar.
- Atur pH larutan campuran standar hingga mencapai 4,5 dengan penambahan larutan natrium asetat 2 M menggunakan alat pH-meter atau kertas penunjuk pH.
- Masukkan larutan campuran standar pada labu ukur 100 ml secara kuantitatif dan encerkan sampai tanda tera dengan air suling, kocok sampai homogen.
- Pipet 10 ml larutan standar vitamin B1 dan B2 100 µg/ml ke dalam labu ukur 100 ml dan encerkan sampai tanda garis dengan air suling, kocok sampai homogen.
- Saring dengan kertas saring whatman No. 40
- Hasil saringan disaring kembali dengan penyaring cartridge C18.
- Larutan disuntikkan pada HPLC.

A.12.5 Persiapan larutan contoh

- Timbang 5 g sampai dengan 7 g contoh dengan teliti yang sebelumnya telah dihaluskan.
- Masukkan dalam labu Erlenmeyer 100 ml.
- Tambahkan 50 ml HCl 0,1 N, kemudian kocok.
- Panaskan pada penangas air dengan suhu 95 °C sampai dengan 100 °C selama 30 menit.
- Dinginkan pada suhu kamar.
- Atur pH larutan contoh hingga mencapai 4,5 dengan penambahan larutan natrium asetat 2 M menggunakan alat pH-meter atau kertas petunjuk pH.
- Masukkan larutan contoh pada labu ukur 100 ml secara kuantitatif dan encerkan sampai tanda tera dengan air suling.
- Pipet 1 ml larutan standar ke dalam labu ukur 100 ml, secara kuantitatif impitkan sampai tanda garis dan kocok
- Saring dengan kertas whatman No. 42.
- Hasil saringan disaring kembali dengan penyaring cartridge C18.
- Larutan siap untuk disuntikkan pada HPLC.
- Kerjakan juga blanko dengan pengerjaan seperti di atas.

A.12.6 Persiapan larutan fase gerak

- Larutkan (0,188 g natrium heksan sulfonat dengan 0,202 g natrium heptan sulfonat atau 0,261 g natrium pentan sulfonat dan 0,202 g natrium heptan sulfonat) dengan campuran methanol: asam asetat: air (32 :1 : 67) ke dalam labu ukur 500 ml, impitkan dan kocok sampai homogen.
- Larutan disaring dalam penyaring Millipore 0,45 µm.
- Larutan fase gerak siap dipakai untuk HPLC.

A.12.7 Analisis contoh dengan HPLC

- Siapkan alat HPLC dengan kondisi seperti diatas.
- Periksa *base line* dengan menyuntikan blanko.
- Suntikan larutan standar.
- Suntikan contoh.

A.12.8 Perhitungan

$$C_{sp} = \frac{\frac{A_{sp}}{A_{st}} \times C_{st} \times F}{W}$$

Keterangan:

F adalah faktor pengenceran,
 C_{sp} adalah konsentrasi contoh (mg/kg),
 A_{sp} adalah area contoh,
 A_{st} adalah area standar,
 C_{st} adalah konsentrasi standar (µg/ml),
 W adalah bobot contoh (g).

A.13 Asam folat

A.13.1 Prinsip

Penetapan asam folat dengan membandingkan asam folat dari contoh terhadap asam folat standar dengan spektrometer pada panjang gelombang 575 nm.

A.13.2 Peralatan

- a) Neraca analitik terkalibrasi dengan ketelitian 0,1 mg
- b) Autoklaf
- c) Inkubator
- d) Lemari pendingin
- e) Spektrometer
- f) Labu ukur 100 ml, 250 ml, dan 500 ml yang terbuat dari kaca berwarna coklat (*amber glass*)
- g) Penutup asah terbuat dari kaca berwarna coklat (*amber glass*)
- h) Tabung reaksi (180 x 18 ml)
- i) Penutup cap – 0 – test
- j) Pipet ukur
- k) Sengkelit (jarum ose)
- l) Kuvet
- m) Sendok
- n) Tabung *centrifuge*
- o) Ball pipet
- p) Botol contoh yang berwarna coklat
- q) Mesin *centrifuge*
- r) Pipettor
- s) Tips pipet
- t) Gelas piala
- u) Corong
- v) Spatula
- w) *Vortex/mixer*
- x) Oven terkalibrasi dengan ketelitian 1 °C

A.13.3 Pembenihan dan pereaksi

- a) Media biakan agar / Difco *lactobacilli* agar AOAC “
- b) Media biakan cair/ Difco *lactobacilli* broth AOAC”
- c) Larutan media induk "Difco folic medium AOAC" (No. 0967-15)
- d) Biakan *Streptococcus faecalis* ATCC. No. 8043

- e) NaCl 0,9 %
- f) Larutan baku asam folat
- g) NH_4OH 0,1 N
- h) Alkohol
- i) HCl 0,1 N
- j) NH_4OH 0,01 N
- k) Air suling

A.13.4 Cara kerja

A.13.4.1 Pengembangan *Streptococcus faecalis*

a. Stok biakan uji organisme

1. Persiapkan biakan uji organisme kedalam lebih dari satu tabung media biakan agar.
2. Inkubasikan selama 6 jam sampai dengan 24 jam pada suhu 30 °C dan (40 ± 0,5) °C, dan terakhir simpan pada 10 °C. Sebelum digunakan pengujian, pindahkan biakan setiap 1 minggu sampai dengan 2 minggu sekali.
3. Persiapkan biakan yang segar maksimal berumur 1 minggu dan jangan gunakan biakan jika lebih dari 1 minggu.

b. Biakan organisme uji

1. Pindahkan biakan stok *Streptococcus faecalis* ATCC. No. 8043 ke dalam tabung steril yang berisi 10 ml media biakan cair.
2. Inkubasikan selama 6 jam sampai dengan 24 jam pada suhu 30 °C dan (40 ± 0,5) °C.
3. Dibawah kondisi aseptik, biakan disentrifus.
4. Hasil sentrifus biakan, bagian atasnya dibuang .
5. Bilas dengan 3 ml sampai dengan 10 ml larutan NaCl 0,9 % steril .

c. Persiapan contoh

1. Tempatkan contoh didalam wadah dan tambahkan air 10 kali atau lebih dari bobot kering contoh (hasil larutan harus mengandung sama dengan atau kurang dari 1,0 mg asam folat / ml).
2. Jika contoh tidak larut, tambahkan lagi larutan dengan menambahkan NH_4OH 0,1N.
3. Contoh diautoklaf selama 15 menit pada suhu 121 °C sampai dengan 123 °C dan dinginkan. Jika ada penggumpalan, kocok sampai larut.
4. Tambahkan air sampai batas volume.
5. Saring contoh atau disentrifuge.
6. Ambil bagian cairan yang jernih, tempatkan dalam labu ukur dan tambahkan air suling.
7. Atur pH sampai menunjukan pH 6,8.
8. Tambahkan lagi dengan air suling sampai batas volume sehingga mengandung asam folat sama dengan atau kurang dari 1,0 mg asam folat / ml.

d. Persiapan larutan asam folat standar

1. Larutan baku 100 µg/ml
Ditimbang sebanyak 50 mg sampai dengan 60 mg asam folat dan simpan didalam desikator yang berisi P_2O_5 dalam, ditambahkan 30 ml NaOH 0,01 M dan tambahkan lagi 300 ml air suling. Atur sampai pH menunjukan 7 sampai dengan 8 dengan HCl, tambahkan lagi air suling sampai konsentrasi asam folat menjadi 100 µg/ml, simpan dalam kondisi gelap pada suhu 10 °C

SNI 3751:2009

2. Larutan intermediat I 1 µg/ml
10 ml larutan 100 µg/ml asam folat, ditambahkan 500 ml air suling, atur pH sampai menunjukkan 7 sampai dengan 8, tambahkan lagi air suling sampai 1 L. Simpan dalam kondisi gelap pada suhu 10 °C
2. Larutan intermediat II 100 µg/ml
100 ml larutan 1 µg/ml asam folat ditambahkan 500 ml air suling, atur pH sampai menunjukkan 7 sampai dengan 8, tambahkan lagi air suling sampai 1 L. Simpan dalam kondisi gelap pada suhu 10 °C
4. Larutan baku kerja
Larutan intermediate II ditambahkan ke dalam deretan seri larutan standar (Tabel 4) Tambahkan air sehingga volume masing-masing deret standar 5 ml (konsentrasi ini biasanya mengandung (1 – 4) ng asam folat/ml. Siapkan standar yang baru untuk masing-masing pengujian

e. Persiapan larutan induk media asam folat

1. siapkan larutan secukupnya sesuai dengan yang diperlukan.
2. siapkan larutan sesuai aturan seperti yang tertera dilabel media.

f. Analisis

1. Siapkan satu seri larutan asam folat standar seperti di bawah ini

Tabel A.1 - Larutan asam folat standar

satuan dalam mililiter

	No. Tabung						
	1	2	3	4	5	6	7
Larutan standar	0.0	0.0	1.0	2.0	3.0	4.0	5.0
Air suling	5	5	4	3	2	1	0
Larutan induk media	5	5	5	5	5	5	5

Siapkan dua tabung untuk setiap nomor dan tutup dengan penutup cap -0-test

Tabung No.1 tidak ditambahkan biakan

Tabung No.2 ditambahkan biakan.

2. Siapkan satu seri larutan contoh seperti di bawah ini

Tabel A.2 - Larutan contoh untuk uji asam folat

satuan dalam mililiter

	No. Tabung			
	1	2	3	4
Larutan contoh	1	2	3	4
Air suling	4	3	2	1
Larutan induk media	5	5	5	5

Siapkan 2 (dua) tabung untuk setiap nomor dan tutup dengan penutup cap-o-tes.

3. Sterilkan tabung tersebut diatas pada suhu (121 -123) °C selama 10 menit.
4. Tambahkan dengan pipet steril/pipettor satu tetes biakan ke dalam semua tabung reaksi tersebut di atas kecuali tabung blanko yang tidak ditambahkan media.
5. Kocok tabung tabung tersebut secara perlahan-lahan sampai media tercampur merata
6. Inkubasi tabung-tabung tersebut pada suhu 30 °C dan (40 ± 0,50) °C untuk beberapa waktu (bila perkembangan mikroorganismanya belum sempurna maka dapat diperpanjang waktu inkubasinya).
7. Ukur dengan spektrometer *transmittance* larutan pada panjang gelombang 575 nm.

A.13.5 Perhitungan

$$\text{Konsentrasi asam folat pada contoh (mg/kg)} = \frac{C \times F \times V \times 1000}{W}$$

Keterangan:

- C adalah konsentrasi yang dibaca dari kurva standar (ng/ml),
 F adalah faktor pengenceran,
 V adalah volume untuk melarutkan contoh (ml),
 W adalah bobot contoh yang ditimbang (g).

A.14 Cemaran logam

A.14.1 Penetapan cemaran logam timbal (Pb) dan kadmium (Cd)

A.14.1.1 Prinsip

Destruksi contoh dengan cara pengabuan kering pada suhu 450 °C yang dilanjutkan dengan pelarutan dalam larutan asam. Logam yang terlarut dihitung menggunakan alat Spektrofotometer Serapan Atom (SSA) dengan panjang gelombang maksimal 228,8 nm untuk Cd dan 283,3 nm untuk Pb.

A.14.1.2 Peralatan

- a) Spektrofotometer Serapan Atom (SSA) beserta kelengkapannya (lampu katoda Cd dan Pb) terkalibrasi (sebaiknya menggunakan SSA tungku grafit);
- b) tanur terkalibrasi dengan ketelitian 1 °C;
- c) neraca analitik terkalibrasi dengan ketelitian 0,1 mg;
- d) penangas listrik;
- e) penangas air;
- f) pipet ukur berskala 0,05 ml atau mikro buret terkalibrasi;
- g) labu ukur 50 ml, 100 ml, dan 1000 ml, terkalibrasi;
- h) gelas ukur kapasitas 10 ml;
- i) gelas piala 250 ml;
- j) cawan porselin/platina/kwarsa dengan kapasitas 50 ml sampai dengan 100 ml;
- k) wadah *polypropylene*; dan
- l) kertas saring tidak berabu dengan spesifikasi *particle retention liquid* sebesar 20-25 µgm.

A.14.1.3 Pereaksi

- a) Larutan asam nitrat, HNO₃ pekat (65 %, Bj 1,4);
- b) larutan asam klorida, HCl pekat (37 %, Bj 1,19);
- c) larutan asam nitrat, HNO₃ 0,1 N;

- encerkan 7 ml HNO_3 65 % dengan air suling dalam labu ukur 1000 ml dan encerkan sampai tanda garis.
- d) larutan asam klorida, HCl 6 N;
encerkan 500 ml HCl 37 % dengan air suling dalam labu ukur 1000 ml dan encerkan sampai tanda garis.
- e) larutan baku 1000 $\mu\text{g/ml}$ Cd;
larutkan 1,000 g Cd dengan 7 ml HNO_3 pekat dalam gelas piala 250 ml dan masukkan ke dalam labu ukur 1000 ml kemudian encerkan dengan air suling sampai tanda garis. Alternatif lain, bisa digunakan larutan baku Cd 1000 $\mu\text{g/ml}$ siap pakai.
- f) larutan baku 200 $\mu\text{g/ml}$ Cd;
pipet 10 ml larutan baku 1000 $\mu\text{g/ml}$ Cd ke dalam labu ukur 50 ml kemudian encerkan dengan air suling sampai tanda garis kemudian dikocok. Larutan baku kedua ini memiliki konsentrasi 200 $\mu\text{g/ml}$ Cd.
- g) larutan baku 20 $\mu\text{g/ml}$ Cd;
pipet 10 ml larutan baku 200 $\mu\text{g/ml}$ Cd ke dalam labu ukur 100 ml kemudian encerkan dengan air suling sampai tanda garis kemudian dikocok. Larutan baku ketiga ini memiliki konsentrasi 20 $\mu\text{g/ml}$ Cd.
- h) larutan baku kerja Cd;
pipet ke dalam labu ukur 100 ml masing-masing sebanyak 0 ml, 0,5 ml, 1 ml; 2 ml; 4 ml; 7 ml dan 9 ml larutan baku 20 $\mu\text{g/ml}$ kemudian tambahkan 5 ml larutan HNO_3 1 N atau HCl 6 N, dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis kemudian kocok. Larutan baku kerja ini memiliki konsentrasi 0 $\mu\text{g/ml}$; 0,1 $\mu\text{g/ml}$; 0,2 $\mu\text{g/ml}$; 0,4 $\mu\text{g/ml}$; 0,8 $\mu\text{g/ml}$; 1,4 $\mu\text{g/ml}$ dan 1,8 $\mu\text{g/ml}$ Cd.
- i) larutan baku 1000 $\mu\text{g/ml}$ Pb;
larutkan 1,000 g Pb dengan 7 ml HNO_3 pekat dalam gelas piala 250 ml dan masukkan ke dalam labu ukur 1000 ml kemudian encerkan dengan air suling sampai tanda garis. Alternatif lain, bisa digunakan larutan baku Pb 1000 $\mu\text{g/ml}$ siap pakai.
- j) larutan baku 50 $\mu\text{g/ml}$ Pb; dan
pipet 5,0 ml larutan baku 1000 $\mu\text{g/ml}$ Pb ke dalam labu ukur 100 ml dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis kemudian kocok. Larutan baku kedua ini memiliki konsentrasi Pb 50 $\mu\text{g/ml}$.
- k) larutan baku kerja Pb;
pipet ke dalam labu ukur 100 ml masing-masing sebanyak 0 ml, 0,2 ml; 0,5 ml; 1 ml; 2 ml; 3 ml dan 4 ml larutan baku 50 $\mu\text{g/ml}$ kemudian tambahkan 5 ml larutan HNO_3 1 N atau HCl 6 N, dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis kemudian kocok. Larutan baku kerja ini memiliki konsentrasi 0 $\mu\text{g/ml}$; 0,1 $\mu\text{g/ml}$; 0,25 $\mu\text{g/ml}$; 0,5 $\mu\text{g/ml}$; 1,0 $\mu\text{g/ml}$; 1,5 $\mu\text{g/ml}$ dan 2,0 $\mu\text{g/ml}$ Pb.

A.14.1.4 Cara kerja

- a) Timbang 10 g sampai dengan 20 g contoh dengan teliti dalam cawan porselin/ platina/ kuarsa (m),
- b) tempatkan cawan berisi contoh uji di atas penangas listrik dan panaskan secara bertahap sampai contoh uji tidak berasap lagi,
- c) lanjutkan pengabuan dalam tanur pada suhu $(450 \pm 5) ^\circ\text{C}$ sampai abu berwarna putih, bebas dari karbon,
- d) apabila abu belum bebas dari karbon yang ditandai dengan warna keabu-abuan, basahkan dengan beberapa tetes air dan tambahkan tetes demi tetes HNO_3 pekat kira-kira 0,5 ml sampai dengan 3 ml,
- e) keringkan cawan di atas penangas listrik dan masukkan kembali ke dalam tanur pada suhu $450 ^\circ\text{C}$ kemudian lanjutkan pemanasan sampai abu menjadi putih. Penambahan HNO_3 pekat dapat diulangi apabila abu masih berwarna keabu-abuan,
- f) larutkan abu berwarna putih dalam 5 ml HCl 6 N, sambil dipanaskan di atas penangas listrik atau penangas air sampai kering, kemudian larutkan dengan HNO_3 0,1 N dan masukkan ke dalam labu ukur 50 ml kemudian tepatkan hingga tanda garis dengan air

- suling (V), jika perlu, saring larutan menggunakan kertas saring, ke dalam wadah *polypropylene*,
- siapkan larutan blanko dengan penambahan pereaksi dan perlakuan yang sama seperti contoh,
 - baca absorbans larutan baku kerja dan larutan contoh terhadap blanko menggunakan SSA pada panjang gelombang maksimum sekitar 228,8 nm untuk Cd dan 283 nm untuk Pb,
 - buat kurva kalibrasi antara konsentrasi logam ($\mu\text{g}/\text{ml}$) sebagai sumbu X dan absorbans sebagai sumbu Y,
 - plot hasil pembacaan larutan contoh terhadap kurva kalibrasi (C), dan
 - hitung kandungan logam dalam contoh.

A.14.1.5 Perhitungan

$$\text{Kandungan logam, (mg/kg)} = \frac{C}{m} \times V$$

Keterangan:

- C adalah konsentrasi logam dari kurva kalibrasi, dinyatakan dalam mikrogram per mililiter ($\mu\text{g}/\text{ml}$);
 V adalah volume larutan akhir, dinyatakan dalam mililiter (ml); dan
 m adalah bobot contoh, dinyatakan dalam gram (g).

A.14.1.6 Ketelitian

Kisaran hasil dua kali ulangan maksimal 16 % dari nilai rata-rata hasil kandungan logam. Jika kisaran lebih besar dari 16 %, maka analisis harus diulang kembali.

A.14.2 Penetapan cemaran logam merkuri (Hg)

A.14.2.1 Prinsip

Mereaksikan senyawa raksa dengan NaBH_4 atau SnCl_2 dalam keadaan asam guna membentuk gas atomik Hg dan diikuti dengan pembacaan absorbans menggunakan spektrofotometer serapan atom tanpa nyala dengan panjang gelombang 253,7 nm.

A.14.2.2 Pereaksi

- Larutan pereduksi
 - Larutan SnCl_2
Campurkan 50 ml H_2SO_4 dengan 300 ml air suling. Dinginkan hingga suhu ruang, tambah 15 g NaCl, 15 g hidrosilaminsulfat, dan 25 g SnCl_2 , impitkan hingga 500 ml atau dapat juga digunakan natrium borohidrida (NaBH_4).
 - Larutan NaBH_4
Larutkan 3 g serbuk NaBH_4 dan 3 g NaOH dalam air suling dalam labu ukur 500 ml.
- Larutan pengencer
Tambahkan 58 ml HNO_3 dan 67 ml H_2SO_4 ke dalam labu ukur 1 L yang mengandung 300 ml – 500 ml air suling, tepatkan sampai tanda garis dengan air suling, dan kocok.
- Larutan baku raksa
 - Larutan baku 1000 mg/l
Larutkan 0,1354 g HgCl_2 dalam 100,0 ml air suling.
 - Larutan kerja 1 mg Hg/l
Encerkan 1 ml larutan baku 1000 mg/l dalam 1 L H_2SO_4 (larutan pengencer). Larutan kerja ini harus dibuat langsung sebelum digunakan.

- Larutan baku standar yang mempunyai konsentrasi akhir 0 µg Hg/ml; 0,0025 µg Hg/ml; 0,005 µg Hg/ml; 0,01 µg Hg/ml; 0,02 µg Hg/ml.
- f) H₂SO₄ 18 N;
- g) HNO₃ 7 N;
- h) Batu didih;
- i) Campuran HNO₄ : HClO₃ (1:1);
- j) H₂O₂
- k) Larutan molibdat 2 %.

A.14.2.3 Peralatan

- Spektrofotometer serapan atom yang dilengkapi dengan lampu katoda Hg dan generator uap hidrida ("HVG")
- Labu destruksi 250 ml berdasar bulat kapasitas 250 ml
- Pendingin terbuat dari borosilikat, diameter 12 mm sampai dengan 18 mm, tinggi 400 mm diisi dengan cincin *Raschig* setinggi 100 mm, kemudian dilapisi dengan batu didih berdiameter 4 mm di atas cincin setinggi 20 mm.
- Labu ukur 25 ml, 100 ml, 500 ml dan 1 000 ml terkalibrasi
- Penangas listrik

A.14.2.4 Cara kerja

A.14.2.4.1 Pengabuan basah

- Timbang 5 g contoh ke dalam labu destruksi, tambah 25 ml H₂SO₄ 18 N, 20 ml HNO₃ 7 N, 1 ml larutan natrium molibdat 2 % dan 5 batu didih – 6 batu didih.
- Hubungkan labu destruksi dengan pendingin dan panaskan di atas penangas listrik selama 1 jam. Hentikan pemanasan dan biarkan selama 15 menit.
- Tambah 20 ml HNO₃ (1:1) melalui pendingin.
- Hentikan aliran air pada pendingin dan panaskan dengan panas tinggi hingga timbul uap putih. Lanjutkan pemanasan selama 10 menit, kemudian dinginkan.
- Dengan hati-hati tambahkan 10 ml air melalui pendingin sambil labu digoyang-goyangkan.
- Didihkan lagi selama 10 menit.
- Matikan pemanas dan cuci pendingin dengan 3 kali 15 ml air suling, dinginkan sampai suhu kamar.
- Secara kuantitatif, pindahkan larutan destruksi contoh ke dalam labu ukur 100 ml, encerkan dengan air suling sampai tanda garis.
- Kerjakan blanko dengan pemakaian pereaksi seperti yang digunakan pada contoh
- Siapkan deret baku dengan konsentrasi akhir 0 µg/ml; 0,0025 µg/ml; 0,005 µg/ml; 0,01 µg/ml dan 0,02 µg/ml Hg.
- Tambahkan larutan pereduksi ke dalam larutan deret baku, larutan destruksi, dan larutan blanko pada alat "HVG".
- Baca absorben larutan deret baku, larutan destruksi dan larutan blanko dengan menggunakan spektrofotometer serapan atom tanpa nyala pada panjang gelombang 253,7 nm,
- Buat kurva kalibrasi dengan sumbu Y sebagai absorben dan sumbu X sebagai konsentrasi dalam ppm dari pembacaan deret larutan baku kerja.
- Hitung kandungan Hg dalam contoh.

A.14.2.4.2 Destruksi menggunakan *microwave* dengan sistim tertutup

- Timbang 0,5 g sampai dengan 1 g contoh ke dalam tabung destruksi, tambah 4 ml HNO₃ dan 1 ml H₂O₂ tutup rapat dan masukkan ke dalam *microwave*. Kerjakan sesuai dengan petunjuk pemakaian alat.
- Secara kuantitatif, pindahkan larutan destruksi contoh ke dalam labu ukur 25 ml, encerkan dengan air suling sampai tanda garis.
- Kerjakan blanko dengan pemakaian pereaksi seperti yang digunakan pada contoh.
- Siapkan deret baku dengan konsentrasi akhir 0 µg/ml; 0,0025 µg/ml; 0,005 µg/ml; 0,01 µg/ml dan 0,02 µg/ml Hg.
- Tambahkan larutan pereduksi ke dalam larutan deret baku, larutan destruksi, dan larutan blanko pada alat "HVG".
- Baca absorben larutan deret baku, larutan contoh dan larutan blanko dengan menggunakan spektrofotometer serapan atom tanpa nyala pada panjang gelombang 253,7 nm.
- Buat kurva kalibrasi dengan sumbu Y sebagai absorben dan sumbu X sebagai konsentrasi dalam ppm dari pembacaan deret larutan baku kerja.
- Hitung kandungan Hg dalam contoh.

A.14.2.5 Perhitungan

$$\text{Kadar Hg(mg/kg)} = \frac{F \times b}{W}$$

Keterangan:

F adalah faktor pengenceran

b adalah µg/ml dari kurva kalibrasi larutan deret baku Hg

W adalah bobot contoh (g).

A.15 Cemarkan arsen**A.15.1 Prinsip**

Contoh didestruksi dengan asam menjadi larutan arsen. Larutan As⁵⁺ direduksi dengan KI menjadi As³⁺ dan direaksikan dengan NaBH₄ atau SnCl₂ sehingga terbentuk AsH₃ yang kemudian dibaca dengan SSA pada panjang gelombang 193,7 nm.

A.15.2 Peralatan

- Spektrofotometer serapan atom yang dilengkapi dengan lampu katoda As dan generator uap hidrida ("HVG").
- Labu destruksi 250 ml berdasar bulat kapasitas 250 ml.
- Pendingin terbuat dari borosilikat, diameter 12 mm sampai dengan 18 mm, tinggi 400 mm diisi dengan cincin *Raschig* setinggi 100 mm, kemudian dilapisi dengan batu didih berdiameter 4 mm di atas cincin setinggi 20 mm.
- Labu ukur 25 ml, 25 ml, 100 ml, 500 ml dan 1000 ml terkalibrasi.
- Penangas listrik.

A.15.3 Pereaksi

- Natrium boronhidrida
Larutkan 3 g NaBH₄ dan 3 g NaOH dalam 500 ml air suling.
- Asam klorida 8 M
Encerkan 66 ml HCl 37 % hingga 100 ml air suling.
- Timah (II) klorida 10 %

Timbang 50 g $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ke dalam gelas piala 200 ml. Tambah 100 ml HCl 37 %. Panaskan hingga larutan jernih. Dinginkan, kemudian tuangkan ke dalam labu ukur 500 ml dan impitkan dengan air suling.

- d) Kalium iodida 20 %
Timbang 20 g KI ke dalam labu ukur 100 ml, dan impitkan dengan air suling (larutan harus dibuat langsung sebelum digunakan).
- e) Larutan standar induk arsen 1000 mg/l
Larutkan 1.3203 g As_2O_3 kering dalam sedikit NaOH 20 %, kemudian netralkan dengan HCl atau HNO_3 1:3 (1 bagian asam: 3 bagian air). Masukkan ke dalam labu ukur 1 L, dan impitkan dengan air suling.
- f) Larutan baku arsen 100 mg/l
Pipet 10 ml larutan baku induk arsen 1000 mg/l ke dalam labu ukur 100 ml, dan impitkan dengan air suling.
- g) Larutan baku arsen 1 mg/l (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$)
Pipet 1 ml larutan standar arsen 100 mg/l ke dalam labu ukur 100 ml, dan impitkan dengan air suling.
- h) Larutan deret standar arsen 0,01 $\mu\text{g}/\text{ml}$; 0,02 $\mu\text{g}/\text{ml}$; 0,03 $\mu\text{g}/\text{ml}$; 0,04 $\mu\text{g}/\text{ml}$; 0,05 $\mu\text{g}/\text{ml}$
Pipet 0,5 ml; 1,0 ml; 1,5 ml; 2,0 ml; dan 2,5 ml larutan baku arsen 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ke dalam labu 50 ml, dan impitkan dengan air suling (larutan harus dibuat baru).
- i) HNO_3 pekat.
- j) HClO_4 pekat.

A.15.4 Persiapan contoh

A.15.4.1 Pengabuan basah

- Timbang 5 g contoh dalam labu destruksi dan tambahkan tambah 20 ml H_2SO_4 p.a dan 15 ml HNO_3 p.a
- Setelah reaksi selesai, panaskan dan tambah lagi HNO_3 pekat sedikit demi sedikit hingga contoh berwarna coklat atau kehitaman.
- Tambah 10 ml HClO_4 sedikit demi sedikit, panaskan lagi hingga larutan menjadi jernih atau berwarna kuning (jika terjadi pengarangan setelah penambahan asam perklorat, tambahkan lagi sedikit HNO_3 p.a)
- Pindahkan secara kuantitatif ke dalam labu ukur 50 ml dan impitkan dengan air suling.

A.15.4.2 Pengabuan kering

- Timbang 5 g contoh dalam cawan, tambah 2,5 g $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ dan 25 ml HNO_3 pekat.
- Aduk dengan sempurna dan uapkan di atas penangas listrik hingga kering.
- Arangkan dalam tanur 500°C selama 2 jam. Basahkan dengan HNO_3 p.a. Uapkan lagi dan abukan lagi selama 1 jam pada 500°C sampai didapat abu berwarna putih.
- Larutkan dengan larutan HCl 1:3 dan impitkan hingga 50 ml dengan air suling.

A.15.4.3 Destruksi dengan *microwave* (sistem tertutup)

- Timbang 0,5 g - 1 g contoh ke dalam tabung destruksi, tambah 2 ml HNO_3 dan 1 ml H_2O_2 , tutup tabung dan masukkan ke dalam alat *microwave*.
- Kerjakan programnya sesuai dengan instruksi kerja alat.
- Setelah dingin, pindahkan secara kuantitatif larutan destruksi ke dalam labu ukur 25 ml dan impitkan dengan air suling.

A.15.5 Cara kerja

- Siapkan NaBH_4 dan HCl dalam tempat yang sesuai dengan yang ditentukan oleh alat.
- Pipet 25 ml larutan destruksi (dari persiapan contoh B.5.4.1 ; B.5.4.2 atau B.5.4.3), tambahkan 2 ml HCl 8 M dan 0,1 ml KI 20 % kemudian biarkan minimal 2 menit.
- Tuangkan larutan tersebut ke dalam tabung contoh pada alat.
- Tuangkan deret standar arsen 0,01 $\mu\text{g/ml}$; 0,02 $\mu\text{g/ml}$; 0,03 $\mu\text{g/ml}$; 0,04 $\mu\text{g/ml}$; 0,05 $\mu\text{g/ml}$ serta blanko ke dalam 6 tabung contoh lainnya. Nyalakan burner serta tombol pengatur aliran pereaksi dan aliran contoh.
- Baca nilai absorben tertinggi dari standar dan contoh dengan blanko sebagai koreksi.
- Buat kurva standar dengan sumbu Y sebagai absorbendan sumbu X sebagai konsentrasi .
- Hitung kandungan arsen dari contoh.

A.15.6 Perhitungan

$$\text{Kadar As(mg/kg)} = \frac{F \times b}{W}$$

Keterangan:

- F adalah faktor pengenceran;
b adalah $\mu\text{g/ml}$ dari kurva kalibrasi larutan deret baku As;
W adalah bobot contoh (g).

A.16 Cemarkan mikroba

A.16.1 Angka lempeng total (metode *plate count*)

A.16.1.1 Prinsip

Pertumbuhan bakteri mesofil aerob setelah contoh diinkubasikan dalam pembenihan yang sesuai selama 72 jam pada suhu 30 °C.

A.16.1.2 Peralatan

- Cawan petri dari gelas / plastik (90 sampai dengan 100 mm).
- Pipet ukur (1,5 ml dan 10 ml).
- Penangas air (45 ± 1) °C.
- Lemari pengering 30 °C.
- Alat penghitung koloni (*colony counter*).
- Otoklaf
- Alat sterilisasi kering (oven).

A.16.1.3 Pembenihan dan pengencer

a) *Buffered peptone water* (BPW)

- | | |
|----------------------------|-------|
| – Peptone | 10 g |
| – Natrium klorida | 5 g |
| – Disodium hidrogen fosfat | 3,5 g |
| – Kalium dihidrogen fosfat | 1,5 g |
| - Air suling | 1 L |

Larutkan bahan-bahan dalam 1 L air suling, atur pH 7,0, masukkan 225 ml atau 450 ml ke dalam botol (labu) 500 ml dan 9 ml ke dalam tabung reaksi. Sterilkan pada suhu 121 °C selama 20 menit.

b) Peptone 0,1 %

- Peptone 1 g
- Air Suling 1 L

Larutkan bahan-bahan dalam 1 L air suling, atur pH 7,0, masukkan 225 ml atau 450 ml ke dalam botol (labu) 500 ml dan 9 ml ke dalam tabung reaksi. Sterilkan pada suhu 121 °C selama 20 menit.

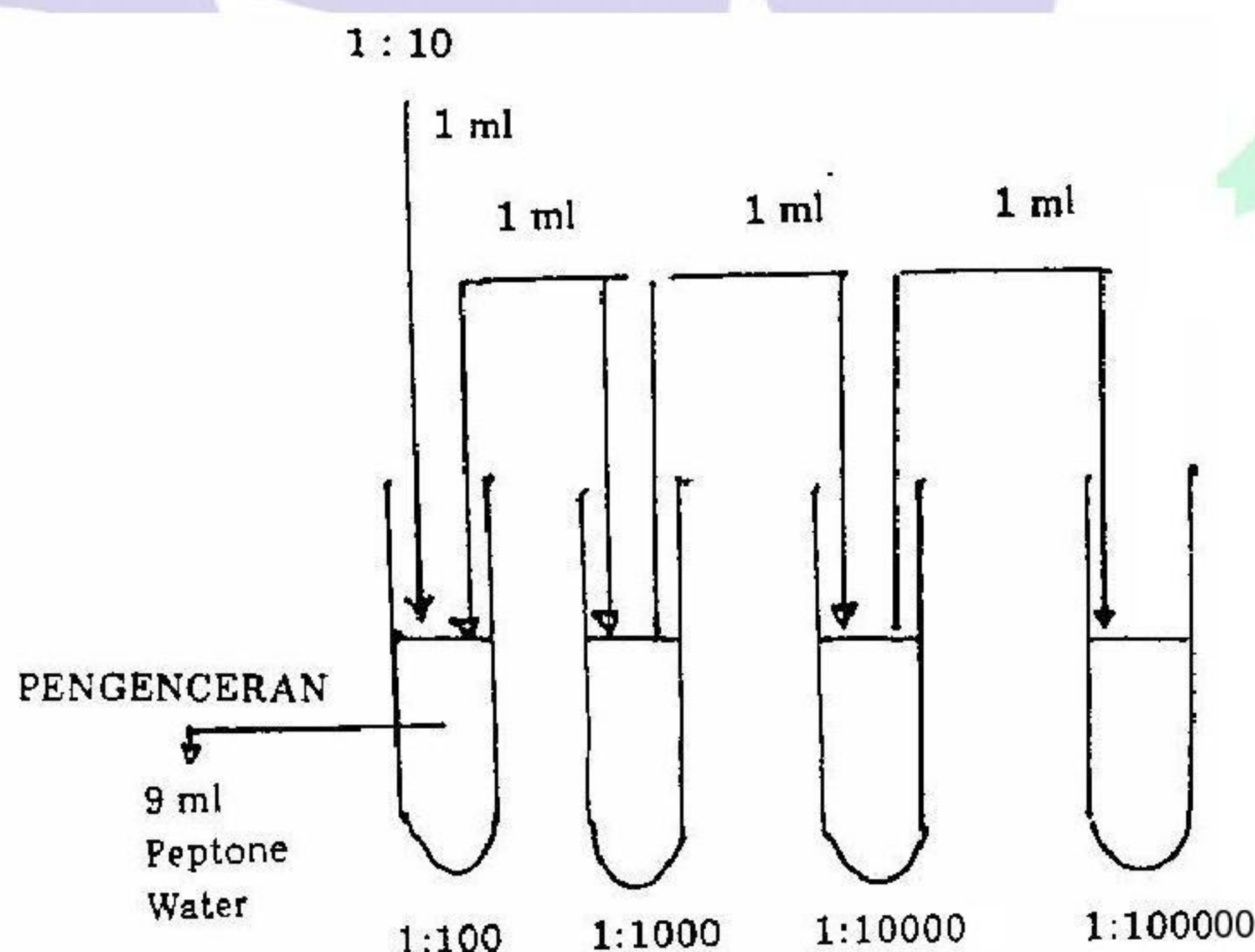
c) *Plate count agar* (PCA)

- *Yeast extract* 2,5 g
- *Pancreatic digest of caseine* 5 g
- Glukosa 1 g
- Agar 15 sampai dengan 20 g
- Air suling 1 L

Larutkan semua bahan-bahan, atur pH 7,0. Masukkan dalam labu, sterilkan pada 121 °C selama 15 menit.

A.16.1.4 Cara kerja

- a) Timbang 25 g contoh, masukkan ke dalam erlenmeyer yang telah berisi 225 ml larutan pengencer hingga diperoleh pengenceran 1:10. Kocok campuran beberapa kali hingga homogen. Pengenceran dilakukan sampai tingkat pengenceran tertentu sesuai keperluan seperti pada Gambar A.1.



Gambar A.1 - Metoda pengenceran

- b) Pipet masing-masing 1 ml dari pengenceran 10^1 – 10^5 ke dalam cawan petri steril secara duplo.
- c) Ke dalam setiap cawan petri tuangkan sebanyak 12 ml sampai dengan 15 ml media PCA yang telah dicairkan yang bersuhu $(45 \pm 1) ^\circ\text{C}$ dalam waktu 15 menit dari pengenceran pertama.
- d) Goyangkan cawan petri dengan hati-hati (putar dan goyangkan ke depan dan ke belakang serta ke kanan dan ke kiri) hingga contoh tercampur rata dengan pembenihan.
- e) Kerjakan pemeriksaan blanko dengan mencampur air pengencer dengan pembenihan untuk setiap contoh yang diperiksa.

- f) Biarkan hingga campuran dalam cawan petri membeku.
- g) Masukkan semua cawan petri dengan posisi terbalik ke dalam lemari pengering dan inkubasikan pada suhu 30 °C selama 72 jam.
- h) Catat pertumbuhan koloni pada setiap cawan petri yang mengandung (25 – 250) koloni setelah 48 jam.
- i) Hitung angka lempeng total dalam 1 g contoh dengan mengalikan jumlah rata-rata koloni pada cawan petri dengan faktor pengenceran yang digunakan.

A.16.1.5 Pernyataan hasil

A.16.1.5.1 Cara menghitung

- (1) Pilih cawan petri dari satu pengenceran yang menunjukkan jumlah koloni antara (25 – 250) koloni setiap cawan petri. Hitung semua koloni dalam cawan petri dengan menggunakan alat penghitung koloni. Hitung rata-rata jumlah koloni dan kalikan dengan faktor pengenceran. Nyatakan hasilnya sebagai jumlah bakteri per g.
- (2) Jika salah satu dari dua cawan petri terdapat jumlah koloni lebih kecil dari 25 atau lebih besar dari 250, hitung jumlah koloni yang terletak antara (25 – 250) koloni, kalikan dengan faktor pengenceran dan nyatakan hasilnya sebagai jumlah bakteri per g.

Contoh:

10^{-2}	10^{-3}
120	25
105	20

$$AL = 120 + 105 + 25 [(1 \times 2) + (0,1 \times 1) \times 10^{-2}] = 11904 \\ = 12000 (1,2 \times 10^4)$$

- (3) Jika hasil dari dua pengenceran jumlahnya berturut-turut terletak antara 25 koloni – 250 koloni, hitung jumlah koloni dari masing-masing pengenceran koloni per g dengan rumus:

$$AL = \sum C [(1 \times n_1) + (0,1 \times n_2) \times d]$$

dimana :

- C adalah jumlah koloni dari tiap-tiap petri
 n_1 adalah jumlah petri dari pengenceran pertama yang dihitung
 n_2 adalah jumlah petri dari pengenceran kedua
d adalah pengenceran pertama yang dihitung

Contoh:

10^{-2}	10^{-3}
131	30
143	25

$$AL = 131 + 143 + 30 + 25 [(1 \times 2) + 0,1 \times 2] \times 10^{-2} = 14954 \\ = 15000 (1,5 \times 10^4)$$

- (4) Bila jumlah koloni dari masing-masing petri lebih dari 25 koloni nyatakan sebagai jumlah bakteri perkiraan.
 - a. Jika jumlah koloni per cm^2 kurang dari 100 koloni, nyatakan hasilnya sebagai jumlah perkiraan: jumlah bakteri dikalikan faktor pengenceran.

Contoh:

10^{-2}	10^{-3}	Jumlah bakteri perkiraan
~	640	$1000 \times 640 = 640.000 (6,4 \times 10^5)$

b. Jika jumlah koloni per cm ² lebih dari 100 koloni, nyatakan hasilnya:			
area x faktor pengenceran x 100	contoh rata-rata jumlah koloni	110 per cm ²	
10 ⁻² 10 ⁻³ area (cm ²)		jumlah bakteri perkiraan	
~ 7150 65		> 65 x 10 ³ x 100 = > 6500.000	(6,5 x 10 ⁶)
~ 6490 59		> 59 x 10 ³ x 100 = > 5900.000	(5,9 x 10 ⁶)

- (5) Jika jumlah koloni dari masing-masing koloni yang tumbuh pada cawan petri kurang dari 25 nyatakan jumlah bakteri perkiraan lebih kecil dari 25 dikalikan pengenceran yang terendah .
- (6) Menghitung koloni perambat (*spreader colony*), ada 3 macam perambat pada koloni, yaitu :
- Merupakan rantai yang tidak terpisah
 - Perambat yang terjadi diantara dasar cawan petri dan pembenihan
 - Perambatan yang terjadi pada pinggir atau penukaran pembenihan.

Apabila terjadi hanya satu perambatan (seperti rantai) maka koloni dianggap satu. Tetapi apabila ada satu atau lebih rantai terbentuk dan berasal dari sumber yang terpisah-pisah, maka uap sumber dihitung sebagai satu koloni.

A.16.1.5.2 Cara menghitung dan membulatkan angka

Dalam melaporkan jumlah koloni atau jumlah koloni perkiraan hanya 2 angka penting yang digunakan, yaitu angka pertama dan kedua (dimulai dari kiri),

- Bila angka ketiga lebih besar dari 5, bulatkan ke atas.
contohnya: 528 dilaporkan sebagai 530 penulisannya (5,3 x 10²)
- Bila angka ketiga kurang dari 5, bulatkan ke bawah.
contohnya: 523 dilaporkan sebagai 520 penulisannya (5,2 x 10²)
- Bila angka ketiga 5, lakukan pembulatan sebagai berikut:
 - Bulatkan ke atas bila angka kedua merupakan angka ganjil.
contohnya: 575 dilaporkan sebagai 580 penulisannya (5,8 x 10²)
 - Bulatkan ke bawah bila angka kedua merupakan angka genap
contohnya: 565 dilaporkan sebagai 560 penulisannya (5,6 x 10²)

A.16.2 *Escherichia coli*

A.16.2.1 Prinsip

Dengan ditandai pembentukan gas pada tabung durham, yang diikuti dengan uji biokimia dan selanjutnya dirujuk pada Tabel APM (Angka Paling Mungkin).

A.16.2.2 Peralatan

- Cawan petri gelas (15 x 100 mm) atau plastik (15 x 90 mm), steril.
- Pipet 1 dan 10 ml berskala;
- Botol pengenceran (± 20 ml) gelas borosilikat yang resistan, dengan sumbat karet atau tutup uliran.
- Lemari Pengeram (Inkubator), (35 ± 1) °C.
- Tabung reaksi (16 x 150 mm) dan tabung Durham.
- Rak untuk tabung reaksi.

- g. Jarum inokulasi, dengan diameter dalam kira-kira 3 mm (ose).
- h. Penangas air tertutup dengan sistem sirkulasi, $(45,5 \pm 0,2) ^\circ\text{C}$.

A.16.2.3 Perbenihan pengencer dan pereaksi

- a. Lauryl Sulfate Tryptose (LST) broth.
- b. Brilliant green lactose bile (BGLB) broth 2 %.
- c. E. C. broth.
- d. Levine's Eosin methylene blue (L-EMB) agar.
- e. Plate Count Agar (PCA).
- f. g stain.
- g. Tryptone broth.
- h. Pereaksi Kovacs.
- i. MR - VP medium.
- j. Pereaksi Voges Proskauer.
- k. Larutan Methyl Red.
- l. Koser's Citrate Medium.
- m. Peptone Water.
- n. Pereaksi Indole.
- o. Larutan Kalium Hidroksida 40 %.
- p. Buffer fields phosfat buffered dilution water (BPBDW).

A.16.2.4 Cara kerja

A.16.2.4.1 *Presumptive test* untuk Bakteri coliform (Uji Dugaan)

A.16.2.4.1.1 Persiapan contoh uji

- a. Lakukan persiapan dan homogenisasi contoh sesuai A.16.1.4.a.
- b. Tiga tabung lauryl sulfate tryptose broth masing - masing diinokulasi dengan 1 ml dari setiap tingkat pengenceran (10^{-1} ; 10^{-2} dan 10^{-3}). Pegang pipet sedemikian sehingga ujung bawah pipet menempel pada tabung. Biarkan isi pipet mengalir 2 sampai dengan 3 detik. Pipet jangan ditiup untuk mengeluarkan isinya.
- c. Inkubasikan tabung-tabung tersebut selama (48 ± 2) jam pada $35 ^\circ\text{C}$.
- d. Setelah (24 ± 2) jam, periksa tabung-tabung yang telah mengandung gas. Ini adalah tabung-tabung yang positif.
- e. Tabung-tabung yang negatif diinkubasikan lagi selama 24 jam.
- f. Catat adanya pembentukan gas dalam jumlah berapapun, setelah inkubasi (48 ± 2) jam, karena ini adalah *presumptive test* yang positif untuk bakteri coliform.
- g. Lakukan *confirmed test* terhadap semua tabung yang positif untuk *presumptive test*.

A.16.2.4.2 *Confirmed test* untuk Bakteri coliform (Uji Penegasan)

- a. Tabung LST yang positif dikocok secara hati-hati dengan cara memutar-mutar tabung.
- b. Pindahkan satu mata ose dari setiap tabung LST yang positif ke dalam tabung BGLB 2 % yang berlainan.
- c. Inkubasikan tabung-tabung BGLB 2 % ini selama (48 ± 2) jam pada suhu $(35 \pm 1) ^\circ\text{C}$.
- d. Catat semua tabung BGLB yang menghasilkan gas dan dengan menggunakan tabel A.4, tentukan APM berdasarkan jumlah tabung BGLB yang memperlihatkan pembentukan gas dalam jumlah berapapun, selama (48 ± 2) jam pada $(35 \pm 1) ^\circ\text{C}$.
- e. Laporkan sebagai APM bakteri coliform per g.

A.16.2.4.3 *Confirmed test* untuk *Escherichia coli*

- a. Tabung LST yang dikocok secara hati-hati dengan cara memutar-mutar tabung.

- b. Pindahkan satu mata ose dari setiap tabung LST yang ke dalam tabung EC broth yang berlainan.
- c. Inkubasikan tabung-tabung EC tersebut ke dalam penangas air yang bersikulasi, selama (48 ± 2) jam pada $(45,5 \pm 0,2) ^\circ\text{C}$. Penangas air yang dipertahankan supaya tetap bersih, tertutup dan dengan tinggi permukaan air di atas permukaan tertinggi media dalam tabung.
- d. Terbentuknya gas dalam jumlah berapapun setelah inkubasi (48 ± 2) jam dianggap.
- e. Tabung-tabung EC yang dikocok hati-hati lalu dari setiap tabung digoreskan/ditanamkan pada satu cawan agar L-EMB, sedemikian rupa hingga dihasilkan koloni yang terpisah-pisah dengan jarak minimum 0,5 cm.
- f. Inkubasikan pinggan agar L-EMB tersebut selama 18 sampai dengan 24 jam pada suhu $(35 \pm 1) ^\circ\text{C}$.
- g. Periksa pinggan-pinggan terhadap adanya koloni yang berwarna coklat dengan atau tanpa kilat logam.
- h. Dari tiap pinggan L - EMB, ambil dengan jarum, paling sedikit 2 koloni yang mencurigakan yang letaknya terpisah dan pindahkan pada tabung agar miring PCA untuk digunakan sebagai inokulum pada uji biokimia.
- i. Tabung-tabung agar miring dari koloni yang dicurigai ini diinkubasikan selama 18 jam sampai dengan 24 jam pada suhu $35 ^\circ\text{C}$. Buatlah pewarnaan Gram dari tiap biakan, *E coli* adalah Gram negatif dan berbentuk batang tak berspora.
- j. Uji sifat - sifat biokimia dengan menggunakan reaksi-reaksi IMVIC.
 - 1) Pembentukan indol
 - Inokulasi tabung *tryptone broth*.
 - Inkubasi selama (24 ± 2) jam pada suhu $(35 \pm 1) ^\circ\text{C}$.
 - Uji adanya indol dengan menambahkan 0,2 ml - 0,3 ml pereaksi Kovacs.
 - Uji ini positif bila lapisan atas berwarna merah.
 - 2) Reaksi Voges Proskauer dan *Methyl red*
 - Inokulasi tabung medium MR - VP dari setiap tabung PCA dan inkubasikan selama (48 ± 2) jam pada suhu $(35 \pm 1) ^\circ\text{C}$.
 - Secara aseptis pindahkan 1 ml biakan tabung reaksi steril.
 - Tambahkan 0,6 ml larutan 5 % alfa naftol dalam alkohol, 0,2 ml larutan KOH 40 % dan beberapa butir kristal kreatin.
 - Uji Voges Proskauer adalah positif bila terbentuk warna eosin merah muda dalam waktu 2 jam.
 - Tabung medium MR - VP yang semula, diinkubasikan kembali selama 48 jam pada $(35 \pm 1) ^\circ\text{C}$.
 - Tambahkan 5 tetes indikator *methyl red* pada setiap tabung.
 - Biakan dianggap MR positif bila terjadi warna merah, MR negatif bila kuning.
 - 3) Penggunaan Sitrat
 - Dengan hati-hati tabung Koser's citrate medium diinokulasi dengan menggunakan jarum lurus sedemikian rupa sehingga hanya mengenai permukaan medium. Terlalu banyak inokulasi dapat menyebabkan terbawanya zat-zat lain.
 - Inkubasikan selama 96 jam pada suhu $(35 \pm 1) ^\circ\text{C}$.
 - Adanya pertumbuhan dalam tabung menandakan uji yang positif (perubahan warna dari hijau ke biru).
 - 4) Pembentukan gas dari *Lactose*
 - Inokulasikan tabung kaldu LST dari setiap agar miring PCA. Inkubasikan selama 48 jam pada suhu $35 ^\circ\text{C}$. Periksa tabung tabung itu terhadap adanya pembentukan gas.

A.16.2.5.4 Klasifikasi dan laporan

- Reaksi biokimia *Escherichia coli* pada uji IMVIC

Tabel A.3 - Reaksi biokimia *Escherichia coli* pada uji IMVIC

Jasad	Indol	Methyl red	Voges Proskauer	Citrate
<i>Escherichia Coli</i>				
Varitas I	+	+	-	-
Varitas II	-	+	-	-

- Klasifikasikan sebagai *E. coli* apabila IMVIC adalah ++-- atau -+--, pewarnaan Gram menunjukkan Gram negatif bentuk batang tidak berspora atau coccus yang membentuk Gas dalam kaldu LST pada waktu inkubasi (48 ± 2) jam.
- Hitunglah APM *E. coli* dengan menggunakan Tabel A.4 berdasarkan jumlah tabung-tabung dari 3 seri pengenceran yang telah dipastikan mengandung *E coli*.

Tabel A.4 - APM per 1 g contoh bila menggunakan 3 tabung untuk setiap tingkat pengenceran (1,0 g/ ml; 0,1 g/ ml, dan 0,01 g/ ml contoh)

Tabung yang positif			APM	Tabung yang positif			APM
1	0,1	0,01		1	0,1	0,01	
0	0	0	< 3	2	2	0	21
0	0	1	3	2	2	1	28
0	1	0	3	2	2	2	35
0	1	1	6	2	3	0	29
0	2	0	6	2	3	1	36
0	3	0	9	3	0	0	23
1	0	0	4	3	0	1	39
1	0	1	7	3	0	2	64
1	0	2	11	3	1	0	43
1	1	0	7	3	1	1	75
1	1	1	11	3	1	2	115
1	2	0	11	3	1	3	159
1	2	1	15	3	2	0	93
1	3	0	16	3	2	1	149
2	0	0	9	3	2	2	215
2	0	1	14	3	2	3	292
2	0	2	20	3	3	0	240
2	1	0	15	3	3	1	462
2	1	1	21	3	3	2	1100
2	1	2	27	3	3	3	-
CATATAN Bila Inokulasi contoh 0,1; 0,01; 0,001 g atau ml untuk masing-masing 3 tabung.							

A.16.3 Kapang

A.16.3.1 Prinsip

Pertumbuhan kapang dalam media yang sesuai, setelah diinkubasikan pada suhu (25 ± 1) °C selama 5 hari.

A.16.3.2 Pembenihan dan pengencer

- *Peptone dilution fluid* atau *pepton water*
- PDA (*Potato Dextrose Agar*) atau pembenihan yang lainnya (*Mycophil*, *MaL Extract Agar*) yang ditambah dengan antibiotik klorotetrasiklin atau kloramfenikol atau streptomisin (250 ml pembenihan ditambah dengan 1 ml larutan 1 g antibiotik dalam 100 ml air suling steril)
- PDA (*Potato Dextrose Agar*)

<i>Infusion from white potatoes</i>	200 g
<i>Dextrose</i>	20 g
<i>Agar</i>	15 g
<i>Air suling</i>	1 L

Larutkan semua bahan. Masukkan dalam labu, sterilkan pada 121 °C selama 15 menit. Sebelum dipergunakan dinginkan sampai 50 °C dan pH diatur 3,5 dengan asam tartrat 10 % steril. Penurunan pH dapat diganti dengan penambahan 4 ml antibiotik (1g/100 ml). Campurkan, kemudian tuangkan ke dalam cawan petri.

A.16.3.3 Peralatan

- Cawan petri (100 x 15 mm).
- Pipet ukur 1 ml dan 10 ml.
- Penangas air (45 ± 1) °C.
- Lemari pengeringan 25 °C atau suhu kamar.
- Alat penghitung koloni.
- Mikroskop

A.16.3.4 Cara kerja

- Lakukan persiapan dan homogenisasi contoh sesuai butir A.16.1.4 a.
- Pipet 1 ml dari masing-masing pengenceran $10^1 - 10^2$ ke dalam cawan petri steril secara duplo. Tuangkan PDA yang telah dicairkan atau perbenihan lainnya (suhu 45 ± 1) °C sebanyak 15 ml sampai dengan 20 ml ke dalam cawan petri dan goyangkan cawan petri sedemikian rupa sehingga campuran tersebar merata.
- Setelah pembenihan membeku, inkubasikan pada suhu (25 ± 1) °C selama 5 hari (tanpa dibalik).
- Hitung koloni kapang (dapat dilakukan mulai hari ke tiga sampai kelima).
- Laporkan atau catat hasil sebagai jumlah kapang per g contoh.

A.16.3.5 Pernyataan hasil

Pilih cawan petri dari satu pengenceran yang menunjukkan jumlah koloni antara 10 koloni – 150 koloni setiap cawan petri. Hitung semua koloni dalam cawan petri dengan menggunakan alat penghitung koloni. Hitung rata-rata jumlah koloni dan kalikan dengan faktor pengenceran. Nyatakan hasilnya sebagai jumlah kapang per g.

Keterangan:

- (1) Koloni kapang biasanya buram dan berbulu.
- (2) Koloni khamir berwarna putih dan licin (berbau asam).
- (3) Tegaskan koloni dengan pemeriksaan di bawah mikroskop sehingga yakin bahwa koloni tersebut adalah kapang.

A.16.4 *Bacillus cereus*

A.16.4.1 Prinsip

Pertumbuhan *Bacillus cereus* ditandai dengan terbentuknya koloni eosin merah muda penghasil *lechitinase*, yang diikuti dengan uji konfirmasi pada berbagai media.

A.16.4.2 Peralatan

- a) Lemari pengering (inkubator), $(30 \pm 2) ^\circ\text{C}$ dan $(35 \pm 2) ^\circ\text{C}$;
- b) alat homogenisasi yang sesuai dengan kecepatan putaran 18000 rpm sampai dengan 21000 rpm;
- c) penangas air, $(48 - 50) ^\circ\text{C}$;
- d) mikroskop;
- e) alat penghitung koloni;
- f) vorteks;
- g) bunsen besar dan kecil;
- h) rak tabung biakan;
- i) botol, steril;
- j) tabung anaerobick GasPak;
- k) tabung biakan, 13 x 100 mm, steril;
- l) pipet 1 ml, 5 ml, dan 10 ml, ketelitian 0,1 ml yang terbuat dari gelas;
- m) cawan petri, 90 mm sampai dengan 100 mm dan 140 mm sampai dengan 150 mm steril;
- n) batang penyebar steril, diameter 3 mm sampai dengan 4 mm dengan area penyebar 45 mm sampai dengan 55 mm;
- o) jarum inokulasi (ose), berukuran 2 mm dan 3 mm; dan
- p) pena penanda.

A.16.4.3 Media dan pereaksi

- a) *Mannitol-egg yolk-polymyxin (MYP) agar plates*;
- b) *egg yolk emulsion*, 50 %;
- c) *trypticase soy-polymyxin broth*;
- d) larutan polimiksin B untuk *MYP agar* (0,1 %) dan *trypticase soy-polymyxin broth* (0,15 %);
- e) lisozyme 0,001 %;
- f) *phenol red glucose broth*;
- g) *tyrosine agar*;
- h) *lysozyme broth*;
- i) *voges-Proskauer medium*;
- j) *nutrient broth*;
- k) *nitrate broth*;
- l) *nutrient agar* untuk *B. cereus*;
- m) *sulfanilic acid reagent*;
- n) *alfa naphthol reagent*;
- o) *butterfield's phosphate-buffered dilution water* yang disterilkan dalam botol dengan volume akhir (450 ± 5) ml dan (90 ± 2) ml;
- p) *Voges-Proskauer test reagents*;
- q) buffer fosfat;
- r) larutan kalsium hidroksida 40 %;
- s) kristal kreatin; dan
- t) metanol.

A.16.4.4 Persiapan contoh

- Secara aseptik, timbang 50 g contoh ke dalam blender yang bersih dan steril. Tambahkan 450 ml *butterfield's phosphate-buffered dilution water* (1:10) dan kocok selama 2 menit pada kecepatan tinggi (18.000 rpm sampai dengan 21.000 rpm), dan
- buat seri pengenceran dengan menggunakan larutan *butterfield's phosphate-buffered dilution water* (1:10).

A.16.4.5 Angka Lempeng Total - *B. cereus*

- Buat tingkat pengenceran dari 10^{-2} sampai dengan 10^{-4} dengan memindahkan 10 ml contoh yang telah dihomogenkan ke dalam 90 ml larutan pengencer, aduk dengan kuat dan lanjutkan ke pengenceran 10^{-4} ,
- inokulasi sebanyak 0,1 ml masing-masing tingkat pengenceran (termasuk 1:10) menggunakan batang penyebar steril di atas permukaan media MYP agar, lakukan secara duplo,
- inkubasikan media MYP agar pada suhu 30 °C selama 24 jam,
- amati koloni yang dikelilingi oleh zona endapan yang menunjukkan bahwa *B. cereus* menghasilkan *lecithinase* berwarna merah muda. Warnanya akan menjadi lebih jelas apabila inkubasi dilanjutkan,
- jika warna tidak jelas, lanjutkan inkubasi selama 24 jam lagi sebelum perhitungan koloni,
- pilih media yang mengandung perkiraan 15 koloni sampai dengan 150 koloni eosin merah muda penghasil *lecithinase*,
- beri tanda di bagian dasar cawan petri berdasarkan zona yang terbentuk menggunakan pena hitam untuk memudahkan perhitungan dan penjumlahan koloni *B. cereus*,
- ambil 5 atau lebih koloni yang positif mengandung *B. cereus* dari media MYP agar dan pindahkan ke media nutrient agar miring untuk konfirmasi *B. cereus*, dan
- hitung jumlah *B. cereus* per gram contoh berdasarkan presentase koloni yang telah diuji dan dikonfirmasi sebagai *B. cereus*.

Contoh perhitungan:

Jika jumlah rata-rata yang diperoleh pada pengenceran 10^{-3} adalah 65 dan 4 dari 5 koloni telah diuji dan dikonfirmasi sebagai *B. cereus* maka jumlah sel *B. cereus* per gram contoh adalah:

$$65 \times 4/5 \times 1.000 \times 10 = 520.000$$

Keterangan:

Faktor pengenceran lebih tinggi sepuluh kali dari pengenceran contoh sebab hanya 0,1 ml contoh diuji

A.16.4.6 APM - *B. cereus*

- Teknik APM direkomendasikan untuk menghitung *B. cereus* dalam contoh yang diharapkan mengandung *B. cereus* lebih kecil dari 10 per gram contoh,
- inokulasikan masing-masing 1 ml larutan dari setiap tingkat pengenceran (larutan 10^{-1} , 10^{-2} dan 10^{-3}) ke dalam tiga tabung *trypticase soy-polymyxin broth*,
- inkubasikan tabung-tabung tersebut dalam inkubator pada suhu 30 °C selama (48 ± 2) jam;
- amati tabung-tabung tersebut pada pada jam ke- (48 ± 2) untuk melihat pertumbuhan bakteri *B. cereus*,
- gores biakan dari tabung yang positif dengan ose ke dalam media MYP agar dan inkubasi selama 24 jam sampai dengan 48 jam pada suhu 30 °C,

- f) ambil 1 atau lebih koloni yang berwarna eosin merah muda dengan *lechitinase* positif dari media MYP agar dan pindahkan ke media nutrisi agar miring untuk konfirmasi *B.cereus*, dan
- g) konfirmasi *B. cereus* dapat dilihat pada B.14.4.7.

A.16.4.7 Uji penegasan untuk *B. cereus*

A.16.4.7.1 Kultur campuran

- a) Ambil 5 atau lebih koloni yang berwarna eosin merah muda dengan *lechitinase* positif dari media MYP agar dan pindahkan ke media agar miring untuk konfirmasi *B.cereus*,
- b) inkubasi selama 24 jam pada suhu 30 °C,
- c) lakukan pengamatan secara mikroskopis, disertai pewarnaan gram. *B. cereus* akan tampak berbentuk batang besar, gram positif, dengan rantai pendek hingga panjang, spora berbentuk elips, letaknya ditengah sampai sub terminal dan spora tersebut tidak menggembungkan sporangium,
- d) pindahkan 3 mm ose biakan dari setiap agar miring ke tabung (13 x 100) mm yang mengandung 0,5 ml larutan bufer fosfat steril kemudian dikocok dengan vorteks, untuk mensuspensikan biakan, dan
- e) suspensi biakan ini digunakan untuk konfirmasi *B. cereus* berikut:

A.16.4.7.2 Uji *phenol red glucose broth*

- a) Inokulasikan 3 ml suspensi biakan menggunakan jarum ose 2 mm,
- b) inkubasi tabung tersebut secara anaerobik selama 24 jam pada suhu 35 °C dalam tabung anaerobik GasPak, dan
- c) kocok tabung tersebut dengan kuat dan amati pertumbuhan *B.cereus* yang ditandai oleh peningkatan kekeruhan dan perubahan warna dari merah ke kuning yang menunjukkan bahwa asam telah dihasilkan secara anaerobik dari glukosa. Perubahan warna dari merah ke orange/kuning bisa terjadi pada sebagian tabung kontrol yang tidak diinokulasi. Hal ini disebabkan oleh terjadinya pengurangan pH akibat pemaparan media oleh CO₂ yang terbentuk dalam tabung anaerobik GasPak. Gunakan kontrol positif dan kontrol negatif untuk menyakinkan perbedaan antara reaksi positif dan positif palsu.

A.16.4.7.3 Uji *nitrate broth*

- a) Inokulasikan 5 ml suspensi biakan menggunakan jarum ose 3 mm,
- b) inkubasi tabung tersebut selama 24 jam pada suhu 35 °C,
- c) untuk uji nitrit, tambahkan 0,25 ml masing-masing pereaksi *sulfanilic acid* dan pereaksi *alpha naphthol* ke dalam setiap tabung, dan
- d) warna oranye yang terbentuk dalam 10 menit menunjukkan bahwa nitrat telah direduksi menjadi nitrit.

A.16.4.7.4 Uji *modified VP medium*

- a) Inokulasikan 5 ml suspensi biakan menggunakan ose 3 mm,
- b) inkubasi tabung tersebut selama (48 ± 2) jam pada suhu 35 °C,
- c) untuk uji *acetylmethyl-carbinol*, pipet 1 ml biakan ke dalam tabung uji (16 x 125) mm, tambahkan 0,6 ml larutan *alpha naphthol*, dan 0,2 ml kalium hidroksida (KOH) 40 %,
- d) aduk dan tambahkan sedikit kristal kreatin,
- e) amati setelah didiamkan selama 1 jam pada suhu ruang, dan
- f) uji positif apabila terbentuk warna ungu.

A.16.4.7.5 Uji *tyrosine* agar

- Inokulasikan suspensi biakan dengan ose 3 mm ke seluruh permukaan media miring agar tirosin,
- inkubasi media miring tersebut selama 48 jam pada suhu 35 °C,
- amati zona bening yang terbentuk yang menunjukkan bahwa tirosin telah terdekomposisi, dan
- jika hasil uji negatif maka inkubasi dilanjutkan selama 7 hari sebelum hasil dinyatakan negatif.

A.16.4.7.6 Uji *lysozyme* broth

- inokulasikan 2,5 ml *nutrient broth* yang mengandung 0,001 % lisozim dengan 2 mm ose suspensi biakan,
- inokulasikan juga 2,5 ml *nutrient broth* tanpa mengandung 0,001 % lisozim sebagai kontrol positif,
- inkubasi tabung tersebut selama 24 jam pada suhu 35 °C,
- uji pertumbuhan dalam *lysozyme broth* dan dalam kontrol *nutrient broth*, dan
- inkubasi tabung negatif selama 24 jam lagi sebelum dibuang.

A.16.4.7.7 Uji MYP agar

- Uji ini tidak diperlukan apabila hasil uji telah jelas dengan menggunakan media agar MYP dan tidak ada gangguan dari mikroorganisme yang lain,
- bagi bagian dasar cawan petri menjadi 6 bagian sampai dengan 8 bagian yang sama menggunakan pena,
- inokulasikan disetiap bagian MYP agar tersebut dengan cara menyentuh permukaan MYP agar dengan 2 mm ose yang berisi kultur secara hati-hati. Dalam satu petri dapat diuji 6 atau lebih kultur,
- biarkan inokulum diserap sempurna sebelum diinkubasikan selama 24 jam pada suhu 35°C,
- amati terbentuknya *lecitinase* yang ditunjukkan oleh zona endapan disekitar pertumbuhan,
- manitol tidak difermentasi oleh isolat jika pertumbuhan dan disekitar media berwarna eosin merah muda. Warna kuning menunjukkan bahwa asam diproduksi dari manitol, dan
- koloni *B. cereus* biasanya positif *lecitinase* dan negatif mannitol pada MYP agar.

A.16.4.7.8 Hasil uji konfirmasi *B. cereus*

Konfirmasi *B. cereus* apabila:

- Menghasilkan gram positif dengan spora yang tidak sebesar sporangium,
- menghasilkan lesitinase dan tidak memfermentasikan manitol dalam media MYP agar,
- tumbuh dan menghasilkan asam dari glukosa secara anaerobik,
- mereduksi nitrat menjadi nitrit
- menghasilkan *acetylmethylcarbinol*,
- menguraikan L-tyrosine, dan
- tumbuh dalam *lysozyme* 0,001 %.

Bibliografi

Codex alimentarius commission 1994, codex stan 1521985 (amended 1991, *codex standard for wheat flour* in codex alimentarius volume V11: *codex standards for cereals, pilses, legumes, derived products*, food and agricuLural organization of the united nations, world heaLh organization, second edition, rome.

AOAC Official Method, 2000 925.08, *Sampling of flour*.

AOAC Official Method, 2000 925.10 *Determination solid (total) and moisture in flour*.

AOAC Official Method, 2000 923.03 *Determination ash of flour*.

AOAC Official Method, 2000 960.52 *Micro Chemical Determination of Nitrogen*.

AOAC Official Method, 2000 940.40. *Copper in food. AAS Method*.

AOAC Official Method, 2000 969.32. *Zinc in food. AAS Method*.

AOAC Official Method, 2000 975.25. *Lead in food. AAS Method*.

AOAC Official Method, 2000 971.21. *Mercury in food. Flameless AAS Method*.

AOAC Official Method, 2000 963.21. *Arsenic in food. AAS Method*.

AACC Method 56-81B, (physico chemical test) *Falling number determination*.

BAM, 2000. *Bacteriological Analytical Manual*.











BADAN STANDARDISASI NASIONAL - BSN
Gedung Manggala Wanabakti Blok IV Lt. 3-4
Jl. Jend. Gatot Subroto, Senayan Jakarta 10270
Telp: 021- 574 7043; Faks: 021- 5747045; e-mail : bsn@bsn.go.id